

obeikandl.com

obeikandl.com

التقنية الحيوية الصناعية

نمو مستدام ونجاح اقتصادي

تحرير

فيم سوتارت **إيريك فاندام**

ترجمة

د. السيد أحمد السيد أحمد

أستاذ مساعد التقنية الحيوية الصناعية – كرسي أبحاث المنتجات الطبيعية –

قسم علم الحيوان – كلية العلوم– جامعة الملك سعود

دار جامعة الملك سعود للنشر

ص ب ٦٨٩٥٣ - الرياض ١١٥٣٧ - المملكة العربية السعودية

obeikandl.com

ⓒ دار جامعة الملك سعود للنشر، ١٤٣٥هـ (٢٠١٤م)

هذه الترجمة العربية مُصرَّح بها من قِبَل مركز الترجمة بالجامعة لكتاب:

Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success
By: Wim Soetaert and Erick J. Vandamme (Editors)
© Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2010

فهرسة مكتبة الملك فهد الوطنية أثناء النشر

سوتارت، فيم.

التقنية الحيوية الصناعية: نمو مستدام ونجاح اقتصادي / فيم سوتارت؛ وإيريك فاندام؛ السيد أحمد السيد أحمد - الرياض، ١٤٣٥هـ.

٦٠١ ص؛ ٢١سم × ٢٨ سم

ردمك: ٨ - ٢٦١ - ٥٠٧ - ٦٠٣ - ٩٧٨

١- الكيمياء الصناعية ٢- التقنية الحيوية أ. فاندام، إيريك (مؤلف مشارك) ب. أحمد، السيد أحمد السيد (مترجم) ج. العنوان

ديوي ٦٦٠ ١٤٣٥/٤٤١٢

رقم الإيداع: ١٤٣٥/٤٤١٢

ردمك: ٨ - ٢٦١ - ٥٠٧ - ٦٠٣ - ٩٧٨

حكمت هذا الكتاب لجنة متخصصة، وقد وافق المجلس العلمي على نشره في اجتماعه السادس للعام الدراسي ١٤٣٤/ ١٤٣٥هـ، المعقود بتاريخ ١٥/ ١/ ١٤٣٥هـ، الموافق ١٨/ ١١/ ٢٠١٣م.

دار جامعة الملك سعود للنشر ١٤٣٥هـ

obeikandl.com

مقدمة المترجم

يتم حالياً تعريف التقنية الحيوية الصناعية على أنها أي تطبيق تقني يستخدم النظم الحيوية أو الكائنات الحية أو مشتقاتها لصنع أو تغيير منتجات أو عمليات من أجل استخدام أو تطبيق معين.

وتمتد جذور التقنية الحيوية الصناعية إلى العصور القديمة حيث تم استخدام الكائنات الدقيقة قبل اكتشافها لتلبية احتياجات ورغبات المجتمع، على سبيل المثال للحفاظ على الحليب والفواكه والخضراوات وتحسين نوعية الحياة من خلال إنتاج الخبز والخمائر والمشروبات والأطعمة المملحة.

وقد أدت زيادة استخدام المصادر الحفرية غير المتجددة وتضاؤلها وزيادة أسعار الوقود الحفري إلى اتساع مفهوم التقنية الحيوية الصناعية وإمكانية تطبيق تقنياتها المختلفة في مجالات جديدة لتوفير مصادر بديلة للموارد الحفرية التي يتزايد الطلب عليها؛ بسبب قلة المعروض منها وكذلك الزيادة الهائلة للسكان. وقد تغلغلت التقنية الحيوية الصناعية في المجالات الرئيسة المهمة وأسهمت بشكلٍ فعال في تطوير التقنيات المستدامة، فعلى سبيل المثال يتم حالياً استخدام الموارد الطبيعية المتجددة مثل المحاصيل الزراعية أو بقاياها أو مخلفات عمليات معالجتها كمواد بادئة مفضلة. وقد انعكس ذلك في توفير مزايا بيئية مهمة حيث كان لتطبيقات التقنية الحيوية الصناعية باستخدام المصادر الطبيعية المتجددة الأثر الكبير في انخفاض انبعاثات غازات الاحتباس الحراري وتغير المناخ العالمي.

يتضمن هذا الكتاب تمهيداً لبدايات التقنية الحيوية الصناعية وتغطية التقنيات الأساسية المستخدمة فيها مثل تقنية التخمير واستخدام الإنزيمات في الصناعة، وكذلك تقنية النانو وعلوم نظم الأحياء والمعلوماتية الحيوية والهندسة الأيضية. وبعد ذلك يناقش الكتاب بعض التطبيقات المختارة في الميادين الأساسية مثل الصناعات الكيميائية والدوائية، وتطبيقات الغذاء والأعلاف، وصناعة الورق، والبلاستيكات الحيوية، والوقود الحيوي. وفي الختام يتعرض الكتاب كذلك لبعض القضايا البيئية والاجتماعية والاقتصادية المتعلقة باستخدام التقنية الحيوية الصناعية.

تهدف هذه الترجمة إلى اتاحة الفرصة للطلاب المهتمين بدراسة التقنية الحيوية الصناعية، وكذلك الأكاديميين والباحثين المتخصصين في مجال التقنية الحيوية وعلى وجه الخصوص التقنية الحيوية الصناعية للتعرف على تطبيقات التقنية الحيوية الصناعية وتغلغلها في معظم مجالات الحياة اليومية. ونأمل من الله تعالى أن يستفيد منها كل طالب علم يريد أن يتعرف بصورةٍ أشمل وأعم على جميع المجالات المختصة وتداخلها وتكاملها مع بعضها ببعض، والله الموفق.

المترجم

obeikandl.com

التمهيد
PREFACE

تتطور في الوقت الحاضر موجة ثالثة من التقنية الحيوية – المصاغة بالتقنية الحيوية الصناعية أو البيضاء بأقصى سرعة. وقد ميزت نفسها بوضوح من التقنية الحيوية الحمراء التي تهدف إلى المجال الطبي، والتقنية الحيوية الخضراء التي تركز على المحاصيل والنباتات المعدلة وراثياً.

وتستغل التقنية الحيوية الصناعية النظم البيولوجية (الصغرى) لإنتاج الكيماويات الدقيقة والضخمة، والمواد، والألياف والطاقة. وتعتمد التقنيات التي تقوم عليها على تقنية التحفيز الحيوي والإنزيمات (استخدام الخلايا والإنزيمات لتحفيز التفاعلات الكيميائية) وعلى تقنية التخمير (الإنتاج الموجه والمحكوم لكميات كبيرة من الخلايا الميكروبية والراقية، وإنزيماتها ونواتج أيضها). وقد عززت الاكتشافات العلمية في طرق الفحص عالية الإنتاجية، وعلم الوراثة الجزيئية، والتطور الموجه، وهندسة الخلايا والإنزيمات، والهندسة الأيضية، وتقنيات الزراعة الحديثة، وعمليات التجهيز النهائي المتكاملة هذا المجال بشكلٍ كبير خلال العقد الماضي.

وقد تطورت التقنية الحيوية الصناعية وأصبحت مساهماً رئيساً في التقنيات المستدامة، مما يؤدي إلى الكيمياء الخضراء، وتقنية إعادة الاستخدام والاقتصاد القائم على المصادر الحيوية؛ وبالفعل يمكن الآن تحويل الموارد المتجددة غير الأحفورية، مثل السكريات والسليولوزات، والزيوت المشتقة من النباتات والحيوانات، وأيضاً مخلفات المعالجات الزراعية والغذائية، وذلك باستخدام تقنية الإنزيمات و/ أو عمليات التخمير، إلى مجموعة واسعة من المركبات الكيميائية، مثل المواد الكيميائية الدقيقة والضخمة، والمذيبات، والمستحضرات الصيدلانية، والبلاستيكات الحيوية، والفيتامينات، والمواد الملونة، وإضافات الأغذية، والمبيدات الحيوية، والوقود الحيوي وغيرها.

ومن الواضح أن التطبيقات المتزايدة للتقنية الحيوية الصناعية توفر مزايا ذات دلالة بيئية. وحيث إن المحاصيل الزراعية المتجددة أو بقاياها هي المواد الأولية المفضلة، فإن هذه التقنية يكون لها تأثيرٌ اجتماعيٌ شاملٌ مفضلٌ على انبعاثات غازات الاحتباس الحراري وتغير المناخ العالمي، وتدعم في الوقت نفسه القطاع الزراعي المزود الأساسي لهذه المواد الخام.

وأيضاً تتغلب التقنية الحيوية الصناعية بالفعل في كثيرٍ من الأحيان على تقنية البتروكيماويات التقليدية في مزايا أداء العملية، مثل ارتفاع معدل التفاعل، وزيادة كفاءة وتخصصية التحويل، وتحسين نقاء المنتج، وانخفاض مدخلات الطاقة الكلية وانخفاض توليد النفايات.

وسوف تؤدي هذه المزايا البيئية والتقنية إلى انتشار سريع للتقنية الحيوية الصناعية في جميع قطاعات الإنتاج المرتبطة بالصناعات الكيميائية، والزراعية والغذائية والبيئية.

وسوف يؤدي هذا إلى تكوين مرافق إنتاج جديدة تسمي بالمصافي الحيوية، حيث يجب أن تتكامل معرفة وتقنية الصناعة الكيميائية والزراعية لصالح المجتمع والكوكب.

يهدف هذا الكتاب إلى تغطية التقنيات المخولة للتقنية الحيوية الصناعية فضلاً عن مجالات تطبيقها على نحوٍ شامل. ويبدأ بفصول تمهيدية على نطاق وآثار وتاريخ التقنية الحيوية الصناعية. ويتم تغطية التقنيات الأساسية والمخولة المستخدمة مثل علم الجينوم الميكروبي، والمعلوماتية الحيوية، والهندسة والنمذجة الأيضية، والتطور الموجه للإنزيمات، وتقنية التخمير، والتحفيز الحيوي، وعلم نظم الأحياء، وتقنية النانو وعمليات التجهيز النهائي في الفصول التالية.

وبعد ذلك تتم مراجعة التطبيقات في قطاع الأغذية والأعلاف، والصناعة الكيميائية والدوائية، وقطاع الورق واللب، والإنتاج الصناعي للإنزيمات، والبلاستيكات الحيوية، والوقود الحيوي.

وفي الختام يتم أيضاً مناقشة الجوانب البيئية، والاقتصادية، والمجتمعية للتقنية الحيوية الصناعية.

وتتم معاملة جميع الجوانب العملية والتقنية المذكورة بواسطة خبراء مشهورين في مجالهم. ويتم الربط بوضوح بين الجوانب التقنية والاقتصادية والبيئية خلال الكتاب.

يدين المحررون بالشكر لطاقم جون وايلي وأولاده (الدكتور راينر موينز، زوي ميلز، والدكتور مارتن جراف) لمساعدتهم التي لا تقدر بثمن خلال مهمة تحرير الكتاب. وقد كانت المساعدة التحريرية للدكتور دومينيك ديلماير (جامعة غنت، مختبر الميكروبيولوجيا الصناعية والتحفيز الحيوي) الذي أطلع المحررين والكتاب جنباً إلى جنبٍ على تقدم طباعة الكتاب، ضرورية لمواصلة وضع جميع المشاركين على المسار الصحيح.

يأمل المحررون أن يشجع هذا الكتاب متخصصي الكيمياء والفيزياء والتقنية الحيوية من الأوساط الأكاديمية والصناعية والزراعية على دمج العقول والجهود، وذلك للمضي قدماً في تطوير تأثير التقنية الحيوية الصناعية في العقود القادمة من أجل صالح مجتمعنا وصحة كوكبنا.

فيم سوتارت

إيريك فاندام

obeikandl.com

قائمة المشاركون في التأليف
LIST OF CONTRIBUTORS

Klaus Ammann
Delft University of Technology, Department of Biotechnology, Working Group on Biotechnology and Society, Julianalaan 67, 2628 BC Delft, The Netherlands.
Uwe T. Bornscheuer
Greifswald University, Institute of Biochemistry, Department of Biotechnology and Enzyme Catalysis, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald, Germany.
Dominique Böttcher
Greifswald University, Institute of Biochemistry, Department of Biotechnology and Enzyme Catalysis, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald, Germany.
Joaquim M.S. Cabral
IBB - Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Biological and Chemical Engineering, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal.
Yusuf Chisti
Massey University, School of Engineering, Private Bag 11 222, Palmerston North 4442, New Zealand.
Charles A. Dana
Drew University, Research Institute for Scientists Emeriti (R.I.S.E.), Madison, NJ 07940, USA.
Arnold L. Demain
Drew University, Research Institute for Scientists Emeriti (R.I.S.E.), Madison, NJ 07940, USA.
Veronika Dornburg
Ghent University, Department of Biochemical and Microbial Technology, Centre of Expertise–Industrial Biotechnology and Biocatalysis, Faculty of Bioscience Engineering, Coupure links 653, 9000 Gent, Belgium.
Pedro Fernandes
IBB - Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Biological and Chemical Engineering, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049 - 001 Lisboa, Portugal.
Maurice Franssen
Wageningen University, Laboratory of Organic Chemistry, Dreijenplein 8, 6703 HB Wageningen, The Netherlands.
Stina Grönqvist
University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology, PO Box 27, Latokartanonkaari 11, 00014 Helsinki, Finland.
Rajni Hatti-Kaul
Lund University, Department of Biotechnology, Box 124, 221 00 Lund, Sweden .
Barbara G. Hermann
Utrecht University, Department of Science, Technology and Society Copernicus Institute, Willem C. van Unnikgebouw, Heidelberglaan 2, 3584 CS Utrecht, The Netherlands.

obeikandi.com

Julian Kinderlerer
Delft University of Technology, Department of Biotechnology, Working Group on Biotechnology and Society Julianalaan 67, 2628 BC Delft, The Netherlands.
Manfred Kircher
Evonik Degussa GmbH, Paul-Baumann–Straße 1, 45772 Marl, Germany.
Rudy J. Koopmans
The Dow Chemical Company, Core R & D, New Products R & D, Dow, Benelux BV, P.O. Box 48, 4530 AA Terneuzen, The Netherlands.
Kristiina Kruus
University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology, PO Box 27, Latokartanonkaari 11, 00014 Helsinki, Finland.
Frédéric Monot
Institut Français du Pétrole, Biotechnology and Biomass Chemistry Department, 1 et 4, avenue de Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison Cedex, France.
Pierre Monsan
INSA UMR CNRS 5504/INRA 792, Laboratory of Biosystems and Process Engineering, 135, avenue de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 04, France.
Jens Nielsen
Technical University of Denmark, Center for Microbial Biotechnology, Department of Systems Biology, Building 223, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark.
Chalmers University of Technology Systems Biology, Department of Chemical and Biological Engineering, 412 96 Göteborg, Sweden.
Michael J. O'Donohue
INSA UMR CNRS 5504/INRA 792, Laboratory of Biosystems and Process Engineering, 135, avenue de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 04, France.
Patricia Osseweijer
Delft University of Technology, Department of Biotechnology, Working Group on Biotechnology and Society Julianalaan 67, 2628 BC Delft, The Netherlands.
Kluyver Centre for Genomics of Industrial Fermentation, Julianalaan 67, 2628 BC Delft, The Netherlands.
José Manuel Otero
Technical University of Denmark, Center for Microbial Biotechnology, Department of Systems Biology, Building 223, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark.
Chalmers University of Technology, Systems Biology Department of Chemical and Biological Engineering, 412 96Göteborg, Sweden.
Ashok Pandey
National Institute for Interdisciplinary, Science and Technology (formerly Regional Research Laboratory) CSIR, Biotechnology Division, Trivandrum - 695 019, India.
Anil Kumar Patel
North Maharashtra University, School of Life Sciences, Jalgaon - 425 001, India .
Martin K. Patel
Utrecht University, Department of Science, Technology and Society, Copernicus Institute, Willem C. van Unnikgebouw, Heidelberglaan 2, 3584 CS Utrecht, The Netherlands.
Jaakko Pere
University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology, PO Box 27, Latokartanonkaari 11, 00014 Helsinki, Finland.
Alexandre Rojey
Institut Français du Pétrole, Biotechnology and Biomass Chemistry Department, 1 et 4, avenue de Bois - Préau 92852 Rueil-Malmaison Cedex, France.
Marlen Schmidt
Greifswald University, Institute of Biochemistry, Department of Biotechnology and Enzyme Catalysis, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald, Germany.
Matti Siika-aho
University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology, PO Box 27, Latokartanonkaari 11, 00014 Helsinki, Finland.

obeikandi.com

Reeta Rani Singhania
National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (formerly Regional Research Laboratory) CSIR, Biotechnology Division, Trivandrum - 695 019, India.
Wim Soetaert
Ghent University, Department of Biochemical and Microbial Technology, Centre of Expertise–Industrial Biotechnology and Biocatalysis, Faculty of Bioscience Engineering, Coupure links 653, 9000 Gent, Belgium.
Anna Suurnäkki
University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology, PO Box 27, Latokartanonkaari 11, 00014 Helsinki, Finland.
Erick J. Vandamme
Ghent University, Department of Biochemical and Microbial Technology, Centre of Expertise–Industrial Biotechnology and Biocatalysis, Faculty of Bioscience Engineering, Coupure links 653, 9000 Gent, .Belgium
Liisa Viikari
University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology PO Box 27, Latokartanonkaari 11, 00014 Helsinki, Finland.
Roland Wohlgemuth
Research Specialties, Sigma - Aldrich, Industriestraße 25, 9470 Buchs, Switzerland.

obeikandl.com

obeikandl.com

المحتويات

مقدمة المترجم ..... هـ
التمهيد ..... ز
قائمة المشاركون في التأليف ..... ط
نطاق وآثار التقنية الحيوية الصناعية
فيم سوتارت وإيريك فاندام ١

الفصل الأول: تاريخ التقنية الحيوية الصناعية
أرنولد ل. ديمان ١٩
(١ , ١) التاريخ المبكر ١٩
(١ , ٢) قصة البنسيلين ٢٥
(١ , ٣) قدوم السيفالوسبورين ٣٢
(١ , ٤) حقبة واكسمان ٣٥
(١ , ٥) تحسين السلالة ٣٧
(١ , ٦) المضادات الحيوية شبه المخلقة لمكافحة الميكروبات المقاومة ٣٩
(١ , ٧) منتجات الأيض الابتدائية ٤٠
(١ , ٧ , ١) الأحماض الأمينية ٤١
(١ , ٧ , ٢) النيكليوتيدات ٤٤
(١ , ٧ , ٣) الفيتامينات ٤٤
(١ , ٧ , ٤) الأحماض العضوية ٤٦
(١ , ٧ , ٥) الكحولات ٤٩

obeikandl.com

(١,٧,٦) البوليمرات ٥٢
(١,٧,٧) السكريات التخصصية، وكحولات السكر، إل-سكريات، سكريات الأوليجو، السكريات العديدة الجديدة التي تفرز خارج الخلية، الصبغات الحيوية، مستحضرات التجميل بما في ذلك العطور، والإنزيمات الميكروبية للتخليق الفراغي وغيرها من التطبيقات ٥٣
(١,٨) التحول من المضادات الحيوية إلى العوامل الدوائية ٥٣
(١,٨,١) مثبطات الإنزيمات ٥٥
(١,٨,٢) مثبطات المناعة ٥٧
(١,٨,٣) مضادات السرطان ٥٨
(١,٨,٤) قلويدات الإرجوت ٥٩
(١,٨,٥) المركبات الزراعية ٥٩
(١,٩) الثورة الصيدلانية الحيوية ٦٢
(١,٩,١) الإنسولين البشري (نوفولين، هومولين) ٦٦
(١,٩,٢) الإرثروبوتين (إيبوجين، بروكريت) ٦٧
(١,٩,٣) الإنترفيرونات ٦٧
(١,٩,٤) هرمون النمو البشري (سوماتوتروبين، سوماتروبين؛ هوماتروبين، نوتروبين، بروتروبين، سوماترين، سيروستيم) ٦٧
(١,٩,٥) منشط بلازمينوجين الأنسجة (أكتيفيز، ألتيبليز) ٦٧
(١,٩,٦) الإنترلوكينات ٦٨
(١,٩,٧) العامل ثمانية ٦٨
(١,٩,٨) العوامل المحفزة للمستعمرة ٦٨
(١,٩,٩) إنزيم الدناز البشري (بالموزايم) ٦٨
(١,٩,١٠) إنزيم الجلوكوسيربروسيديز (سيريزيم) ٦٩
(١,٩,١١) الأجسام المضادة أحادية النسيلة ٦٩
(١,٩,١٢) مستحضرات صيدلانية بيولوجية إضافية ٧٠
(١,١٠) العوائل المعدلة وراثياً ٧٠
(١,١٠,١) إيشيريشيا القولون (إيشيريشيا كولاي) ٧٠
(١,١٠,٢) الخمائر ٧٢

obeikandl.com

(٣, ١٠, ١) الفطريات ٧٢
(٤, ١٠, ١) الخلايا الحشرية ٧٣
(٥, ١٠, ١) الخلايا الثديية ٧٣
(٦, ١٠, ١) الحيوانات المعدلة وراثياً ٧٤
(٧, ١٠, ١) النباتات المعدلة وراثياً ٧٤
(١١, ١) الإنزيمات ٧٤
(١٢, ١) التحويلات الحيوية ٧٨
(١٣, ١) اللقاحات ٧٨
(١٤, ١) علم ميكروبيولوجي الأنظمة ٧٩
المراجع ٧٩

الفصل الثاني: بيولوجيا الأنظمة الصناعية

خوزي مانويل أوتيرو و ينس نيلسين ٨٩
(١, ٢) المقدمة ٨٩
(٢, ٢) التقنية الحيوية الصناعية ٩٠
(٣, ٢) دوافع السوق للتقنية الحيوية الصناعية ٩٦
(٤, ٢) بيولوجيا الأنظمة الصناعية ٩٧
(٥, ٢) نماذج الأيض ١٠٠
(١, ٥, ٢) الأيض الميكروبي – منظور تاريخي ١٠٠
(٢, ٥, ٢) تسلسل الجينوم وعلم الجينوم الوظيفي ١٠٤
(٦, ٢) نماذج شبكات الأيض المعاد هيكلتها ١١٥
(١, ٦, ٢) مقدمة ١١٥
(٢, ٦, ٢) عملية الشبكة المعاد هيكلتها لمعيار الجينوم ١١٧
(٧, ٢) دراسات حالة لبيولوجيا الأنظمة الصناعية ١٢٧
(١, ٧, ٢) منتج تقني حيوي صناعي ناضج ومطور: الإيثانول الحيوي ١٢٨
(٢, ٧, ٢) منتج تقني حيوي صناعي حديث وسريع التطور: ١،٣-بروبان دايول ١٣٢
(٣, ٧, ٢) منتج تقني حيوي صناعي قيد التطوير: حمض السكسينيك ١٣٥

obeikandi.com

(٨ , ٢) الخاتمة والمنظور المستقبلي..... ١٤٠
المراجع..... ١٤٢

الفصل الثالث: تقنية التخمير

يوسف شيستي ١٥٥
(١ , ٣) المقدمة ١٥٥
(٢ , ٣) أنواع التخمير ١٥٥
(٣ , ٣) عملية التخمير ١٥٦
(١ , ٣ , ٣) تحضير اللاقح..... ١٥٨
(٢ , ٣ , ٣) النمو وتكوين المنتج..... ١٥٨
(٤ , ٣) تصميم بيئة التخمير ١٦٠
(٥ , ٣) تعقيم الهواء وبيئة التخمير ١٦١
(٦ , ٣) العوامل البيئية..... ١٦٢
(٧ , ٣) حركية التخمير..... ١٦٤
(١ , ٧ , ٣) التخمرات أحادية الدفعة..... ١٦٤
(٢ , ٧ , ٣) الزراعات المستمرة..... ١٦٥
(٨ , ٣) معدات التخمير..... ١٦٦
(١ , ٨ , ٣) التخمير المغمور..... ١٦٦
(١ , ١ , ٨ , ٣) مخمر خزان التقليب ١٦٦
(٢ , ١ , ٨ , ٣) عمود الفقاعات..... ١٦٧
(٣ , ١ , ٨ , ٣) مخمر الهواء المرفوع..... ١٦٨
(٤ , ١ , ٨ , ٣) مخمر الوسادة المعلقة..... ١٦٨
(٥ , ١ , ٨ , ٣) مخمر الوسادة المتغلغلة..... ١٦٨
(٢ , ٨ , ٣) التخمير الصلب ١٧٣
(١ , ٢ , ٨ , ٣) المخمر ذو الأدراج..... ١٧٤
(٢ , ٢ , ٨ , ٣) المخمر الوسادة الثابتة..... ١٧٤
(٣ , ٢ , ٨ , ٣) المخمر ذو النفق ١٧٥

obeikandi.com

(٤ , ٢ , ٨ , ٣) مخمر القرص الدوار ١٧٥
(٥ , ٢ , ٨ , ٣) مخمر البرميل الدوار ١٧٦
(٦ , ٢ , ٨ , ٣) مخمر الخزان المقلب ١٧٦
(٧ , ٢ , ٨ , ٣) مخمر اللولب المستمر ١٧٧
(٩ , ٣) استعادة منتجات التخمير ١٧٧
(١٠ , ٣) ملاحظات ختامية ١٧٨
المراجع ١٧٩

الفصل الرابع: التطور الموجه للمحفزات الحيوية الصناعية

مارلين شميدت، دومينيك بوتشر، أوفي بورنشويار ١٨١
(١ , ٤) المقدمة ١٨١
(٢ , ٤) إستراتيجيات تصميم البروتين ١٨٢
(١ , ٢ , ٤) التصميم الرشيد للبروتين ١٨٢
(٢ , ٢ , ٤) التطور الموجه ١٨٣
(١ , ٢ , ٢ , ٤) طرق التطفير ١٨٣
(٣ , ٢ , ٤) التطور موجه المركز ١٨٦
(٣ , ٤) نظم الفحص ١٨٨
(١ , ٣ , ٤) الاختيار ١٨٨
(١ , ١ , ٣ , ٤) تقنيات الاظهار ١٨٩
(٢ , ١ , ٣ , ٤) الاختيار داخل الخلايا ١٩٠
(٢ , ٣ , ٤) الفحص ١٩١
(١ , ٢ , ٣ , ٤) طرق الفحص بالهيدروليز ١٩٢
(٢ , ٢ , ٣ , ٤) طرق الفحص بالأوكسيدوريداكتيز ١٩٤
(٣ , ٢ , ٣ , ٤) طرق الفحص بالهيدروكسي نيتريل ليز ١٩٥
(٤ , ٤) أمثلة ١٩٦
(١ , ٤ , ٤) الاستيريزات، والليبيزات، والفوسفوليبيزات ١٩٦
(٢ , ٤ , ٤) النيتريليز ١٩٩

obeikandi.com

(٣, ٤, ٤) الهالوهيدرين ديهالوجينيز ٢٠٠
(٤, ٤, ٤) المونوأوكسيجينيز P450 ..... ٢٠٠
(٥, ٤, ٤) الألدوليزات ٢٠١
(٥, ٤) الاستنتاجات ٢٠٢
المراجع ٢٠٦

الفصل الخامس: الإنتاج الصناعي للإنزيمات

ريتا راني سينغانيا، أنيل كومار باتيل، و أشوك باندي ٢١٥
(١, ٥) المقدمة ٢١٥
(٢, ٥) إنتاج الإنزيم ٢١٦
(١, ٢, ٥) اختيار الإنزيم المناسب ٢١٦
(٢, ٢, ٥) اختيار سلالة إنتاج مناسبة ٢١٧
(٣, ٢, ٥) طريقة الإنتاج ٢١٨
(١, ٣, ٢, ٥) التخمير بالطريقة المغمورة ٢١٩
(٢, ٣, ٢, ٥) التخمير بالحالة الصلبة ٢٢٠
(٤, ٢, ٥) المعاملة النهائية ٢٢١
(٣, ٥) تحسين الإنزيم ٢٢٢
(١, ٣, ٥) تقنية الحامض النووي المعدل ٢٢٣
(٢, ٣, ٥) هندسة البروتين ٢٢٤
(٤, ٥) تطبيقات الإنزيم على المستوى الكبير ٢٢٦
(١, ٤, ٥) المنظفات ٢٢٦
(٢, ٤, ٥) صناعة الغذاء ٢٢٦
(١, ٢, ٤, ٥) الخبز ٢٢٦
(٢, ٢, ٤, ٥) تحليل النشا وإنتاج الفركتوز ٢٢٨
(٣, ٢, ٤, ٥) المشروبات والألبان ٢٢٨
(٣, ٤, ٥) الأعلاف ٢٢٩
(٤, ٤, ٥) المنسوجات ٢٢٩

obeikandi.com

(٥,٤,٥) الورق واللب ٢٣٠
(٥,٤,٦) الجلود ٢٣١
(٥,٤,٧) الوقود الحيوي من الكتلة الحيوية ٢٣١
(٥,٤,٨) تطبيقات الإنزيم في قطاعات الكيمياء والدواء ٢٣١
(٥,٤,٩) الإنزيمات التخصصية ٢٣٢
(٥,٤,١٠) الإنزيمات في منتجات العناية الشخصية ٢٣٢
(٥,٤,١١) الإنزيمات في تقنية الحمض النووي ٢٣٣
(٥,٥) الاستنتاجات ٢٣٣
المراجع ٢٣٤

الفصل السادس: التحفيز الحيوي التطبيقي: نظرةٌ عامة

بيدرو فيرناندیز و یواخیم کابرال ٢٣٧
(٦,١) المقدمة ٢٣٧
(٦,٢) تصميم نظام التحويل الحيوي ٢٣٩
(٦,٢,١) المحفز الحيوي ٢٣٩
(٦,٢,١,١) الاختيار ٢٣٩
(٦,٢,١,٢) خلايا كاملة أو إنزيمات معزولة؟ ٢٤٠
(٦,٢,١,٣) تقييد المحفزات الحيوية ٢٤٣
(٦,٢,٢) بيئة التحويل الحيوي ٢٤٨
(٦,٢,٢,١) المذيبات العضوية ٢٥٠
(٦,٢,٢,٢) السوائل الأيونية ٢٥٢
(٦,٢,٢,٣) النظم المائية ذات المرحلتين ٢٥٣
(٦,٢,٢,٤) الراتنجات الصلبة ٢٥٣
(٦,٢,٢,٥) نظم الغاز-الصلبة ٢٥٤
(٦,٢,٢,٦) السوائل فوق الحرجة ٢٥٤
(٦,٣) المفاعلات الحيوية ٢٥٥
(٦,٣,١) مفاعلات الدفعة الواحدة ٢٥٥

obeikandl.com

(٦,٣,٢) مفاعلات التغذية على دفعات ٢٥٦
(٦,٣,٣) مفاعلات التغذية المستمرة ٢٥٦
(٦,٤) ترشيد وتسريع تطوير وتوصيف عملية التحويل الحيوي ٢٥٧
(٦,٤,١) الطرق الحسابية ٢٥٧
(٦,٤,٢) طرق المعالجة دقيقة المقياس ٢٥٨
(٦,٥) ملاحظات ختامية ٢٥٩
المراجع ٢٦٠

الفصل السابع: تقنية النانو الحيوية

رودي كووبمانز ٢٦٥
(٧,١) تجهيز المسرح ٢٦٥
(٧,٢) المنظور الصناعي ٢٦٦
(٧,٣) تقنية النانو في علم الأحياء والكيمياء الحيوية ٢٦٧
(٧,٤) محاكاة الطبيعة ٢٦٩
(٧,٤,١) ألياف الحرير ٢٦٩
(٧,٤,٢) لاصقات أبو بريص ٢٧١
(٧,٤,٣) الصدف والترسيب الحيوي للمعادن ٢٧٣
(٧,٥) المواد والمنتجات ٢٧٤
(٧,٥,١) الببتيدات والبروتينات ٢٧٤
(٧,٥,١,١) تطبيقات الببتيدات والبروتينات ذاتية التجميع ٢٧٥
(٧,٥,١,٢) الببتيدات المضادة للميكروبات ٢٧٦
(٧,٥,١,٣) البروتينات المضادة للتجمد ٢٧٧
(٧,٥,١,٤) المهجنات المخلقة حيوياً ٢٧٨
(٧,٥,٢) البولي نيوكليوتيدات ٢٧٨
(٧,٥,٣) الدهون ٢٧٩
(٧,٥,٤) الكربوهيدرات ٢٨١
(٧,٦) العمليات والأجهزة ٢٨٢

obeikandl.com

(١, ٦, ٧) الآلات النانوية ٢٨٢
(٢, ٦, ٧) الحساسات الحيوية والرقاقات الحيوية ٢٨٥
(٣, ٦, ٧) المفاعلات الحيوية ٢٨٧
(٤, ٦, ٧) المحفزات ٢٨٧
(٥, ٦, ٧) سقالات التدعيم ٢٨٨
(٧, ٧) التوقعات ٢٨٩
المراجع ٢٨٩

الفصل الثامن: عمليات التجهيز النهائي في التقنية الحيوية الصناعية

راجني هاتي-كاول ٢٩٥
(١, ٨) المقدمة ٢٩٥
(٢, ٨) الفصل في التقنية الحيوية الصناعية ٢٩٧
(١, ٢, ٨) فصل الجسيمات الصلبة ٢٩٧
(١, ١, ٢, ٨) الترشيح ٢٩٩
(٢, ١, ٢, ٨) الترشيح الدقيق ٣٠٠
(٣, ١, ٢, ٨) الطرد المركزي ٣٠١
(٤, ١, ٢, ٨) الهيدروسيكلون ٣٠٢
(٥, ١, ٢, ٨) التعويم والاستخلاص ٣٠٢
(٢, ٢, ٨) تمزيق الخلايا لتحرير المنتجات المرتبطة بالخلية ٣٠٤
(٣, ٢, ٨) فصل الجزيئات اعتماداً على الحجم ٣٠٥
(١, ٣, ٢, ٨) الترشيح الغشائي ٣٠٥
(٢, ٣, ٢, ٨) الفصل اللوني باستبعاد الحجم ٣٠٩
(٤, ٢, ٨) الفصل اعتماداً على تطاير المنتج ٣١٠
(١, ٤, ٢, ٨) التقطير ٣١٠
(٢, ٤, ٢, ٨) التجريد الغازي ٣١٠
(٣, ٤, ٢, ٨) التقطير الغشائي والتبخير المسبق ٣١١
(٥, ٢, ٨) الفصل اعتماداً على ذوبان المنتج ٣١٣

obeikandl.com

(٨,٢,٥,١) الاستخلاص..... ٣١٣
(٨,٢,٥,٢) الترسيب والبلورة..... ٣١٨
(٨,٢,٦) فصل الجزيئات اعتماداً على الادمصاص على مصفوفة صلبة ٣٢٠
(٨,٢,٦,١) الفصل اللوني الادمصاصي ٣٢٣
(٨,٢,٦,٢) الفصل اللوني المستمر..... ٣٢٦
(٨,٢,٧) مواد التبصيم الجزيئي لالتقاط المنتج انتقائياً..... ٣٢٩
(٨,٢,٨) الفصل الغشائي للمواد المذابة الأيونية: الفصل الغشائي الكهربائي..... ٣٢٩
(٨,٢,٩) الفصل الفراغي باستخدام الأغشية..... ٣٣١
(٨,٢,١٠) الإزالة بالتجفيف/ المذيبات ٣٣١
(٨,٣) أمثلة على التجهيز النهائي لمجموعات المنتجات المختلفة ٣٣٢
(٨,٣,١) الكحولات..... ٣٣٢
(٨,٣,٢) الأحماض العضوية..... ٣٣٣
(٨,٣,٣) الأحماض الأمينية ٣٣٥
(٨,٣,٤) الإنزيمات والبروتينات/ الببتيدات..... ٣٣٦
(٨,٣,٥) المضادات الحيوية ٣٣٧
(٨,٣,٦) الكاروتينات..... ٣٣٧
(٨,٣,٧) المستحلبات الحيوية ٣٣٨
(٨,٣,٨) البولي هيدروكسي ألكانوات..... ٣٣٩
شكر وتقدير ٣٣٩
المراجع..... ٣٣٩

الفصل التاسع: التقنية الحيوية الصناعية في الصناعات الكيميائية والدوائية

موريس فرانسن، مانفريد كيرشر، و رولاند وولجيموث ٣٤٣
(٩,١) المقدمة..... ٣٤٣
(٩,٢) عمليات الحفز الحيوية: وجهات النظر العلمية والتقنية ٣٤٤
(٩,٢,١) المضادات الحيوية البيتا-لاكتام ٣٤٤
(٩,٢,١,١) النواة..... ٣٤٤

obeikandl.com

(٩,٢,١,٢) السلاسل الجانبية ٣٤٥
(٩,٢,١,٣) التخليق نصف الإنزيمي ٣٤٧
(٩,٢,٢) وحدات البناء الفراغية ٣٤٨
(٩,٢,٣) وحدات البناء للبوليمرات ٣٤٨
(٩,٢,٤) الكيماويات الدقيقة: الستاتينات ٣٥١
(٩,٢,٥) الأحماض الأمينية ٣٥٥
(٩,٢,٦) الإنديجوتين ٣٥٨
(٩,٣) عمليات التحفيز الحيوي: السوق والمنظور التجاري ٣٥٩
(٩,٤) السلامة والصحة والمنظور البيئي ٣٦٤
(٩,٥) التوقعات ٣٦٤
شكر وتقدير ٣٧١
المراجع ٣٧١

الفصل العاشر: التقنية الحيوية الصناعية في قطاع الغذاء والأعلاف

بيير مونسان وميشائيل ج. أودنوا ٣٧٥
(١٠,١) المقدمة ٣٧٥
(١٠,٢) تطبيقات الغذاء ٣٧٦
(١٠,٢,١) تحويل النشا ٣٧٦
(١٠,٢,٢) صناعة الألبان ٣٧٨
(١٠,٢,٢,١) إنزيمات تخثر اللبن ٣٧٨
(١٠,٢,٢,٢) إنضاج الجبن والنكهة ٣٧٩
(١٠,٢,٢,٣) الليبيزات ٣٧٩
(١٠,٢,٢,٤) البروتييزات ٣٨٠
(١٠,٢,٢,٥) الليسوزيم ٣٨٠
(١٠,٢,٢,٦) الإنزيم الناقل للجلوتامين ٣٨٠
(١٠,٢,٢,٧) بيتا-جالاكتوسيديز ٣٨١

obeikandl.com

(١٠,٢,٣) صناعة الخبز ٣٨٢
(١٠,٢,٣,١) الأميليزات ٣٨٢
(١٠,٢,٣,٢) الزيلانيزات ٣٨٢
(١٠,٢,٣,٣) إنزيمات الأكسدة ٣٨٢
(١٠,٢,٣,٤) الفوسفوليبيز ٣٨٣
(١٠,٢,٣,٥) الديكسترانسكريز ٣٨٤
(١٠,٢,٤) صناعة البيرة ٣٨٤
(١٠,٢,٤,١) التخمير ٣٨٤
(١٠,٢,٤,٢) منع البرد الضبابي في البيرة ٣٨٤
(١٠,٢,٥) معاملة الفاكهة ٣٨٥
(١٠,٢,٥,١) البكتينيزات ٣٨٥
(١٠,٢,٥,٢) التعطين الإنزيمي للثمار ٣٨٦
(١٠,٢,٥,٣) العنب وصناعة النبيذ ٣٨٧
(١٠,٣) الأغذية وتطبيقات الأعلاف ٣٨٧
(١٠,٣,١) البروبيوتيك ٣٨٧
(١٠,٣,٢) البريبيوتيك ٣٨٩
(١٠,٣,٢,١) الإنيولين ٣٩٠
(١٠,٣,٢,٢) سكريات الفركتوأوليجو ٣٩٠
(١٠,٣,٢,٣) سكريات الجالاكتوأوليجو ٣٩١
(١٠,٣,٢,٤) سكريات الجلوكوأوليجو ٣٩٣
(١٠,٣,٢,٥) النشا المقاوم ٣٩٦
(١٠,٤) تطبيقات الأعلاف ٣٩٨
(١٠,٤,١) تحليل الفيتات ٣٩٨
(١٠,٤,٢) تحليل الكربوهيدرات ٤٠٠
(١٠,٤,٣) إنتاج الأحماض الأمينية ٤٠١
المراجع ٤٠٣

obeikandl.com

الفصل الحادي عشر: التقنية الحيوية الصناعية في قطاع الورق واللب

ليزا فيكاري، ستينا جرونكفيست، كريستينا كروووس، جاكو بيري، ماتي سيبكا-أهو، و آنا سورناكي ٤١٣
(١ ,١١) المقدمة ٤١٣
(٢ ,١١) الإنزيمات لصناعة اللب والورق ٤١٥
(١ ,٢ ,١١) السليوليزات ٤١٦
(٢ ,٢ ,١١) الهيميسليوليزات ٤١٧
(٣ ,٢ ,١١) الترانسفيريزات ٤١٩
(٤ ,٢ ,١١) الإنزيمات المؤكسدة المعدلة للجنين ٤١٩
(١ ,٤ ,٢ ,١١) البيروكسيديزات ٤٢٠
(٢ ,٤ ,٢ ,١١) اللاكيزات ٤٢١
(٣ ,١١) الإنزيمات كمساعدات في العملية ٤٢٢
(١ ,٣ ,١١) استخلاص اللب ٤٢٤
(١ ,١ ,٣ ,١١) استخلاص اللب كيميائياً ٤٢٤
(٢ ,١ ,٣ ,١١) استخلاص اللب ميكانيكياً ٤٢٥
(٢ ,٣ ,١١) التبييض ٤٢٧
(١ ,٢ ,٣ ,١١) التبييض بمساعدة الزيلانيز ٤٢٧
(٢ ,٢ ,٣ ,١١) نظام وسيط اللاكيز لنزع اللجنين للتبييض المباشر ٤٢٩
(٣ ,٣ ,١١) صناعة الورق ٤٣٠
(٤ ,٣ ,١١) الورق المعاد تدويره وإزالة الأحبار ٤٣١
(٥ ,٣ ,١١) التحكم في الشحم ٤٣٢
(٦ ,٣ ,١١) التطبيقات الأخرى ٤٣٢
(٤ ,١١) الإنزيمات لتصميم المنتجات ٤٣٣
(١ ,٤ ,١١) الهندسة الإنزيمية للألياف ٤٣٣
(٢ ,٤ ,١١) الألياف الوظيفية المضافة القيمة ٤٣٣
(٥ ,١١) مفاهيم المصفاة الحيوية ٤٣٤
(٦ ,١١) الاستنتاجات ٤٣٦
المراجع ٤٣٦

obeikandl.com

الفصل الثاني عشر: الوقود الحيوي: الإنتاج والتطبيقات

أليكساندري روجي وفريدريك مونوت..... ٤٤٣
(١ ,١٢) تجدد الاهتمام في الوقود الحيوي ٤٤٣
(٢ ,١٢) مسارات التحويل الحالية ٤٤٣
(٣ ,١٢) إنتاج وقود الديزل الحيوي من الزيوت والدهون النباتية ٤٤٦
(١ ,٣ ,١٢) عمليات الأسترة ٤٤٦
(٢ ,٣ ,١٢) خصائص إسترات الزيوت النباتية ٤٤٨
(٣ ,٣ ,١٢) عمليات الهدرجة..... ٤٤٩
(٤ ,١٢) إنتاج الإيثانول والـ (ETBE) ٤٥٠
(١ ,٤ ,١٢) إنتاج الإيثانول من السكر والنشا ٤٥٠
(٢ ,٤ ,١٢) إنتاج الـ (ETBE) ٤٥١
(٣ ,٤ ,١٢) خصائص الإيثانول والـ (ETBE)..... ٤٥٢
(٥ ,١٢) الحاجة للتطويرات الجديدة ٤٥٢
(٦ ,١٢) مصادر الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية ٤٥٣
(٧ ,١٢) إنتاج الإيثانول من الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية..... ٤٥٤
(١ ,٧ ,١٢) مخطط التحويل العام ٤٥٤
(٢ ,٧ ,١٢) المعالجة المسبقة للكتلة الحيوية..... ٤٥٥
(٣ ,٧ ,١٢) التحليل الإنزيمي ٤٥٥
(٤ ,٧ ,١٢) تخمير الجلوكوز والبنتوزات ٤٥٦
(٨ ,١٢) إنتاج الوقود الحيوي من خلال المسار الكيميائي الحراري ٤٥٧
(١ ,٨ ,١٢) الوضع الحالي ٤٥٧
(٢ ,٨ ,١٢) الانحلال الحراري والتحميص..... ٤٥٨
(٣ ,٨ ,١٢) إنتاج وقود السيارات الاصطناعي من الكتلة الحيوية ٤٥٩
(٩ ,١٢) المصافي الحيوية ٤٦١
(١٠ ,١٢) الوقود الحيوي والاستدامة ٤٦٢
(١١ ,١٢) الاستنتاج..... ٤٦٣
المراجع..... ٤٦٣

obeikandl.com

الفصل الثالث عشر: الجوانب البيئية والاقتصادية للتقنية الحيوية الصناعية

باربرا ج. هيرمان، فيرونيكا دورنبورج و مارتين ك. باتيل ٤٦٥
(١٣,١) المقدمة ٤٦٥
(١٣,٢) المنهجية ٤٦٦
(١٣,٢,١) النهج العام ٤٦٦
(١٣,٢,١,١) الخلفية المنهجية ٤٦٦
(١٣,٢,١,٢) تصميم العملية لطرق التقنية الحيوية الصناعية ٤٦٧
(١٣,٢,١,٣) الافتراضات التقنية لطرق التقنية الحيوية الصناعية ٤٦٨
(١٣,٢,١,٤) استخدام الطاقة ٤٧٢
(١٣,٢,٢) منهجية التأثيرات البيئية ٤٧٢
(١٣,٢,٢,١) حدود النظام ٤٧٣
(١٣,٢,٢,٢) تخصيص وتوسيع النظام ٤٧٣
(١٣,٢,٢,٣) إنتاج سكر التخمير ٤٧٤
(١٣,٢,٢,٤) جرد دورة الحياة ٤٧٥
(١٣,٢,٢,٥) المؤشرات البيئية ٤٧٥
(١٣,٢,٣) اقتصاديات العملية ٤٧٦
(١٣,٢,٣,١) أسعار سكريات التخمير ٤٧٨
(١٣,٢,٣,٢) أسعار المرافق والمواد المساعدة ٤٧٩
(١٣,٣) النتائج العامة ٤٧٩
(١٣,٣,١) نتائج التحليل البيئي ٤٧٩
(١٣,٣,٢) نتائج التحليل الاقتصادي ٤٨٤
(١٣,٤) الاستنتاجات ٤٨٧
المراجع ٤٨٨

الفصل الرابع عشر: القضايا الاجتماعية في التقنية الحيوية الصناعية

باتريشيا أوسيوايجر، كلاوس أمان و جوليان كيندرليرر ٤٩١
(١٤,١) المقدمة ٤٩١
(١٤,٢) أثر التقنية الحيوية الصناعية ٤٩٣

obeikandl.com

(١٤,٢,١) كيف يؤثر هذا على مجتمعنا؟ ٤٩٤
(١٤,٢,٢) ما هي المحفزات والعقبات السياسية والصناعية والاقتصادية والعلمية؟ ٤٩٥
(١٤,٣) التصورات العامة للتقنية الحيوية الصناعية ٤٩٦
(١٤,٣,١) ما هو التصور العام الحالي للتقنية الحيوية الصناعية؟ ٤٩٧
(١٤,٣,٢) ما هو تأثير التصور العام على تطوير السياسات؟ ٤٩٩
(١٤,٣,٣) ردود الفعل الصناعية على توسيم منتجات الغذاء المعدلة وراثياً ٥٠٠
(١٤,٣,٤) تطوير التفاعل العام ٥٠٣
(١٤,٤) قضايا مجتمعية في التقنية الحيوية الصناعية ٥٠٥
(١٤,٤,١) معايير التواصل ٥٠٥
(١٤,٤,٢) أساليب جديدة للتواصل ٥٠٧
(١٤,٤,٣) ثلاث حلقات عمل دولية لتعريف القضايا المستقبلية في التقنية الحيوية الصناعية: دراسة حالة ٥٠٨
(١٤,٤,٤) مزيد من تحليل القضايا المجتمعية المحددة المتعلقة بالتقنية الحيوية الصناعية ٥١١
(١٤,٤,٥) الدراسات وتقارير اللجان المتصلة الأخرى ٥١٦
(١٤,٥) الاستنتاجات والمناقشة: جدول أعمال مشترك للإدخال السلس لتقنية حيوية صناعية مستدامة مقبولة ..٥١٦
(١٤,٥,١) العقبات والتحديات ٥١٧
(١٤,٥,٢) التوصيات لمزيدٍ من الدراسات ٥١٨
(١٤,٥,٣) ما الذي يعنيه هذا للمواطنين؟ ٥١٨
شكر وتقدير ٥١٨
المراجع ٥١٩
ثبت المصطلحات ٥٢٣
أولاً: عربي – إنجليزي ٥٢٣
ثانياً: إنجليزي – عربي ٥٦٠
كشاف الموضوعات ٥٩٧

obeikandi.com

نطاق وآثار التقنية الحيوية الصناعية

THE SCOPE AND IMPACT OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY

فيم سوتارت و إيريك فاندام

Wim Soetaert and Erick J. Vandamme

مقدمة Introduction

تمكنت التقنية الحيوية الصناعية أو البيضاء في الآونة الأخيرة من التميز بوضوح عن التقنية الحيوية الحمراء التي تستهدف القطاع الطبي، والتقنية الحيوية الخضراء التي تركز على المحاصيل المعدلة وراثياً. وتستخدم التقنية الحيوية الصناعية الأنظمة الحيوية لإنتاج الكيماويات والمواد والطاقة. وتستند هذه التقنية في المقام الأول على التحفيز الحيوي (استخدام الإنزيمات لتحفيز التفاعلات الكيميائية) وعلى تقنية التخمير (استخدام الكائنات الدقيقة)، بالاشتراك مع الاكتشافات في علم الوراثة الجزيئية والتطورات الموجهة، وهندسة الإنزيمات والهندسة الأيضية في الكائنات الدقيقة والخلايا.

وحالياً يكتسب مصطلح "التقنية الحيوية البيضاء"، والذي اقترح في البداية من قبل هيئات صنع القرار في الاتحاد الأوروبي زخماً كبيراً في جميع أنحاء العالم، وهو يغطي مجال التقنية الحيوية الصناعية، حيث تشير "البيضاء" إلى الجوانب البيئية الإيجابية المرتبطة بتطبيق التقنية الحيوية الصناعية. وقد تطورت هذه التقنية الحيوية الجديدة إلى مساهم رئيس فيما يعرف بمجال "الكيمياء الخضراء"، والتي يتم فيها تحويل الموارد المتجددة مثل السكريات والزيوت النباتية إلى الكثير من المواد الكيميائية مثل الكيماويات الدقيقة والضخمة، والمستحضرات الصيدلانية، والملونات الحيوية والمذيبات والبلاستيكات الحيوية، والفيتامينات، وإضافات الأغذية، فضلاً عن الوقود الحيوي مثل الإيثانول الحيوي والديزل الحيوي [١-٥].

وتوفر تطبيقات التقنية الحيوية الصناعية أو "البيضاء" مزايا بيئية عديدة. فبدلاً من تضاؤل الموارد الحفرية مثل النفط الخام والغاز الطبيعي، فإن المحاصيل الزراعية المتجددة تعدُّ المواد البادئة المفضلة. وعليه تمتلك هذه

التقنية تأثيراً مفيداً على إنبعاثات غازات الاحتباس الحراري وفي الوقت نفسه تدعم القطاع الزراعي، والذي يعدُّ المصدر لهذه المواد الخام. وعلاوة على ذلك، فكثيراً ما تظهر التقنية الحيوية الصناعية فوائد عظيمة مقارنة بالتقنيات الكيميائية التقليدية، من حيث ارتفاع معدل التفاعل، وارتفاع كفاءة التحويل، وتحسين نقاوة المنتج، وخفض استهلاك الطاقة، والانخفاض الكبير في إنتاج المخلفات الكيميائية. وقد أدت هذه العوامل مجتمعة إلى التغلغل القوي للتقنية الحيوية الصناعية في جميع قطاعات الصناعة الكيميائية، ولا سيما في الكيماويات الدقيقة، وكذلك على قدم المساواة في مجال الكيماويات الضخمة، مثل المواد البلاستيكية والوقود. وقد قدرت نسبة مشاركة عمليات الإنتاج المعتمدة على التقنية الحيوية في الصناعات الكيميائية في عام ٢٠٠٣م بحوالي ٥٪، ومن المقدر لها أن تصل إلى ١٠٪ بحلول عام ٢٠١٠م [٦].

وتقف حالياً قوانين اقتصاد السوق بشكل أساسي خلف هذا التطور في ضوء الكفاءة العالية لإنتاجية عمليات التقنية الحيوية. ومن المتوقع في المستقبل القريب أن يعزز الكثير من التغيرات الاجتماعية والتقنية هذا الاتجاه بشكل أكبر، مثل نضوب احتياطيات النفط الخام والطلب المتزايد لسكان العالم على الطاقة والمواد الخام والحاجة للاستدامة والكفاءة في أنظمة الإنتاج الكيميائية وكذلك التغيرات في السياسات الزراعية [٧، ٨].

وتهتم الصناعات الكيميائية والزراعية الاقتصادية بشكل مباشر بالتطورات التي تحدث في التقنية الحيوية الصناعية، ويمكن إنشاء أنشطة كيميائية جديدة تماماً في صورة مصافي حيوية من التعاون بين هاتين الصناعتين. كما يمكن للتقنية الحيوية الصناعية أن تسهم أيضاً بدرجةٍ كبيرة في مستقبل الزراعة في جميع أنحاء العالم.

وعلاوةً على ذلك، فإن هناك حاجة لبذل جهود متضافرة لزيادة الوعي العام حول التقنية الحيوية الصناعية، مع الفائدة المضافة أن هذا من المرجح أن يحسن نظرة المستهلك للتقنية الحيوية بصورة كلية؛ نظراً للصلة الواضحة بين التقنية الحيوية الصناعية والتنمية المستدامة في مجتمعنا [٩، ١٠].

الكيمياء المستدامة أو الخضراء Sustainable or Green Chemistry

تعد الصناعة الكيميائية قطاعاً إنتاجياً مهماً جداً، كما تعد في الوقت نفسه مستخدماً كبيراً للمصادر الحفرية ومصدراً مهماً للمخلفات، وينتج هذا القطاع الصناعي نطاقاً واسعاً من المركبات والتي يمكن تقسيمها إلى المجموعات التالية: الكيماويات الدقيقة، والمنتجات الصيدلانية، والكيماويات الضخمة، والبلاستيكات، والوقود.

ويواجه الباحثون والكيميائيون والمهندسون الكيميائيون تحديات كبيرة لتطوير عمليات كيميائية مستدامة تحترم البيئة، وتحسن نوعية حياتنا، وفي نفس الوقت ذات تنافسية في السوق. ويشمل هذا تطوير عمليات إنتاج جديدة تميل إلى الحد من أو منع استخدام المواد الخطرة، والتقليل من استهلاك الطاقة وإنتاج النفايات، وتبدأ على

قدر المستطاع من المصادر الخام المتجددة. ويكمن الهدف النهائي في تطوير تقنية كيميائية نظيفة، بدءاً من المواد الخام والطاقة المتجددة، مع الحد الأدنى من إنتاج المخلفات، والإنتاجية القصوى والقدرة التنافسية.

وتعتمد الكيمياء المستدامة على نطاقٍ من التقنيات المختلفة، بدءاً من العمليات الكيميائية التقليدية الأكثر فعالية، واستخدام المواد الحفازة الأفضل، وطرق الفصل الجديدة مثل العمليات الغشائية، وتقنية إعادة التدوير وإعادة الاستخدام، وأخيراً وليس آخراً، استخدام التقنية الحيوية الصناعية. وتؤثر التقنية الأخيرة بشكل متزايد على القطاع الكيميائي، ويعد هذا انعكاساً لحقيقة أن التقنية الحيوية مناسبة بطبيعة الحال للكيمياء المستدامة [٦، ٧، ١١]. في حين أن استخدام المواد الخام المتجددة يكون صعباً نوعاً ما في عمليات البتروكيماويات التقليدية، فإنه يمكن للتقنية الحيوية الصناعية أن تتعامل مع هذه المواد الخام المتجددة بسهولةٍ مذهلة. وتتحقق استدامة هذه التقنية من خلال انخفاض استهلاك الطاقة وإنتاج المخلفات، واستخدام المواد الخام غير الخطرة، وغير المؤذية، والمتجددة، والكفاءة العالية. وتخترق التقنية الحيوية الصناعية الصناعة الكيميائية بشكلٍ تدريجي، وكانت النتائج إيجابية للغاية فيما يتعلق بالاستدامة وكذلك القدرة التنافسية الصناعية.

وإنه لمن المهم أن نؤكد على أن التقنية الحيوية الصناعية ليست هي التقنية الوحيدة في هذا المسعى لتحقيق الاستدامة. وتتكون معظم الكيمياء المستدامة من تفاعل بين التقنيات المختلفة. في الواقع، فإنه يمكن الحصول على أفضل النتائج من الدمج المناسب للتقنية الكيميائية التقليدية و التقنية الحيوية الصناعية. وتميل العمليات الجديدة بشكلٍ متزايد إلى أن تكون ما يعرف بالتخليقات التجميعية (Combi-syntheses)، والتي تتألف من عدد من الخطوات الكيميائية والتقنية الحيوية. أيضاً تم استخدام تقنيات الفصل المبتكرة مثل تقنية الفصل الغشائي والمذيبات ذات درجات الحرارة فوق الحرجة بشكل متزايد، مما يزيد من الكفاءة البيئية لهذه "الكيمياء الخضراء" [١، ٦، ٧، ١١].

التقنية الحيوية الصناعية كتقنية متعددة التخصصات

Industrial Biotechnology as a Multidisciplinary Technology

تشمل التقنية متعددة التخصصات التطبيق المتكامل لتخصصات الكيمياء الحيوية والمعلوماتية الحيوية والوراثة الجزيئية وتقنية العمليات؛ وذلك بهدف تطوير عمليات ومنتجات مفيدة، معتمدة على الخلايا الميكروبية، أو الحيوانية، أو النباتية، وكذلك عضيات أو إنزيمات هذه الخلايا كمحفزات حيوية. وقد تلقت الكائنات الدقيقة على وجه الخصوص الكثير من الاهتمام بوصفها أداة للتقنية الحيوية، وتستخدم فيما يعرف بعمليات التخمير. ويتواجد الكثير من البكتيريا والخمائر والفطريات المفيدة على نطاقٍ واسع في الطبيعة، ولكن نادراً ما تجد الظروف المثلى للنمو وتكوين المنتج في بيئاتها الطبيعية. وفي الظروف الاصطناعية (في المختبر)، يمكن للتقني الحيوي التدخل في بيئة الخلية الميكروبية (في المخمر أو المفاعل الحيوي)؛ وكذلك في مادتها الوراثية (الحمض النووي)؛ لتحسين

التحكم وتوجيه عمليات الأيض الخلوية خلال عمليات التخمير. وبسبب قدرتها التخليقية المتنوعة العالية، وسهولة استخدامها للمواد الخام المتجددة، ومعدلاتها العالية من التفاعلات الميكروبية، ونموها السريع، والسهولة النسبية لتعديل مادتها الوراثية، فإن الكثير من الكائنات الدقيقة فعالة للغاية، وفي كثير من الحالات لا غنى عنها في مختلف قطاعات التقنية الحيوية الصناعية.

وقد استعملت التقنية الحيوية الصناعية لفترة طويلة في عدد من القطاعات، بما في ذلك الرعاية الصحية، والصناعات الغذائية والكيمياء الدقيقة. وفي الوقت الحاضر، تتغلغل هذه التقنية على نحوٍ متزايد في قطاعات مثل الكيمياء الضخمة وإمدادات الطاقة، وذلك في عالمٍ أصبحت فيه التنمية المستدامة هي كلمة السر.

وقد أشارت دراسة ماكينزي أن حصة السوق الصناعية من التقنية الحيوية الصناعية سوف تتزايد بقوة في جميع المجالات بحلول عام ٢٠١٠م، ولا سيما في إنتاج المواد الكيميائية الدقيقة. وتقدر درجة التغلغل في عام ٢٠١٠م بما يتراوح بين ٣٠-٦٠٪ للمواد الكيميائية الدقيقة وبين ٦-١٢٪ للبوليمرات والمواد الكيميائية الضخمة. وبالنسبة لكامل الصناعات الكيميائية، فقد قدرت نسبة انتشار التقنية الحيوية بنسبة ٥٪ في عام ٢٠٠٣م، وارتفعت إلى ١٠٪ في عام ٢٠١٠م، وستزيد بشدة بعد ذلك. وسوف تعتمد سرعة الانتشار على عدد من العوامل في المقام الأول، مثل أسعار النفط الخام والمواد الخام الزراعية، والتطورات التقنية، والإرادة السياسية اللازمة لدعم وهيكلة هذه التقنيات الجديدة.

استخدام المصادر المتجددة مقابل المصادر الحفرية Use of Renewable Versus Fossil Resources

من المؤكد أن استخدام المصادر المتجددة كمواد خام للأغراض التقنية (غير الغذائية) ليس بالجديد [٨، ١١، ١٢]. وقد استخدم الناس هذه المواد من بدء الحضارات فصاعداً. فقد استخدم البشر المواد الخام المعتمدة على النبات والحيوان لتلبية احتياجاتهم الأساسية، مثل الألياف الطبيعية للملابس، والخشب للتدفئة، والدهون الحيوانية للإضاءة، والأصباغ الطبيعية للمنسوجات والأعمال الفنية، وما إلى ذلك.

واعتمدت الأنشطة الصناعية الأولى بشكلٍ كبير على استخدام الموارد المتجددة. واستمر هذا حتى الثورة الصناعية، عندما كان هناك تغيير جوهري في القرن التاسع عشر بظهور كيمياء الكربون (استناداً على الفحم، المواد العطرية والغاز التخليقي)، وفي القرن العشرين من خلال تطوير البتروكيمياء. وانخفض استخدام المواد الخام المتجددة بشكل ملحوظ، ويرجع ذلك أساساً لانخفاض أسعار الموارد البتروكيميائية. خلال هذه الفترة، اعتمدت الصناعات الكيميائية بشكل أساسي على الموارد البتروكيماوية. وفي أيامنا هذه، فإن جزءاً كبيراً من الصناعات الكيميائية يعتمد على الموارد البتروكيميائية، كما تستند أيضاً احتياجاتنا من الطاقة إلى حد كبير على الوقود الحفري

مثل الفحم، والنفط، والغاز الطبيعي. وحالياً، فإن ٨ , ٩٥٪ من جميع المواد الكيميائية العضوية التي تنتج في أوروبا (بما في ذلك الوقود) تعتمد على المصادر الحفرية.

ومع ذلك، فإن عدداً لا بأس به من الصناعات المهمة لا يزال في الوقت الحاضر يعتمد على المواد الخام المتجددة. لأن نصف الألياف المستخدمة في صناعة الغزل والنسيج هي ألياف طبيعية (القطن، الصوف، الكتان، ...إلخ)، وتمدنا صناعة الزيوت الكيميائية باحتياجاتنا اليومية من الصابون والمنظفات اعتماداً على الزيوت النباتية، ولاتزال صناعة البناء تستخدم الكثير من الأخشاب والألياف الطبيعية الأخرى كمواد البناء، ...إلخ. وعلاوةً على ذلك، لا تقدم البتروكيمياء بديلاً واقعياً لاستخدام المواد الخام في الكثير من التطبيقات المهمة. فعلى سبيل المثال، إن تصنيع كل المضادات الحيوية لا يزال يتم تقريباً عن طريق عمليات التخمير، ابتداءً من السكريات الطبيعية كما أن حوالي نصف احتياجاتنا من الأدوية ما زالت تعزل من الكائنات الحية.

وقد أدت أزمة النفط بين عامي ١٩٧٣ – ١٩٧٩م، عندما رفعت أوبك أسعار النفط من ٢ دولار أمريكي إلى ٣٠ دولاراً للبرميل الواحد (١ برميل = ١٥٩ لتر)، إلى تجدد الاهتمام بالمصادر المتجددة. ونتيجةً لهذه الأزمة، فقد نما قلق كبير إزاء تزايد الاعتماد على الموارد الحفرية، وحقيقة توفر هذه الموارد بصورةٍ دائمة. وقد أدى هذا القلق إلى حد كبير إلى توجيه الاهتمام السياسي بمسألة الطاقة، وأسفر عن الكثير من الدراسات بشأن تطوير مصادر بديلة للطاقة. وأكدت نتائج هذه الدراسات أن المواد الخام المتجددة لم تكن (حتى الآن) تنافسية، وأن الحماس تجاه المواد الخام المتجددة سرعان ما اختفى عندما انخفضت أسعار النفط مرة أخرى، وتحول الاقتصاد مرة أخرى إلى التحكم كالمعتاد.

وفي التسعينيات، أضافت المناقشات حول التنمية المستدامة وتأثير الاحتباس الحراري، وكذلك ظهور الأحزاب السياسية الخضراء نبضاً جديداً. كما كانت المشكلات المتصلة بالفوائض الغذائية في الاتحاد الأوروبي أيضاً قوة دافعة مهمة. فبسبب التكاليف الباهظة المرتبطة بهذه الفوائض الغذائية، فقد تدخل الاتحاد الأوروبي بقوة في السياسة الزراعية المشتركة للاتحاد الأوروبي. ولهذا الغرض، وضعت دول الاتحاد الأوروبي في عام ١٩٩٢م مبدأ "الأرض المجنبة". ووفقاً لهذا المبدأ، تم تقديم إعانات للمزارعين لترك أجزاء من أراضيهم بغير زراعة، من أجل الحد من الإفراط في الإنتاج. وبعد ذلك، وفي إطار السياسة الزراعية المشتركة للاتحاد الأوروبي، تم إنشاء الفرص لاستخدام هذه الأراضي لغير الأغراض الزراعية. وهكذا، يمكن للمزارعين الحصول على إيرادات إضافية من هذه الأرض.

مع زيادة الوعي والاهتمام حول النفايات الصناعية وآثارها على البيئة، نشأت الحاجة للمركبات الوسيطة الأفضل القابلة للتحلل والمنتجات النهائية الأفضل. ويمكن لهذه المنتجات القابلة للتحلل الطبيعي أن تتحلل إلى مكونات، والتي يمكن امتصاصها مرة أخرى إلى الدورة الطبيعية، وذلك على النقيض من المنتجات الثابتة التي لا تختفي (أو فقط و بشكل غير مقبول بعد فترة طويلة) من البيئة أو من خلال السلسلة الغذائية. وقد كانت قابلية

التحلل الحيوي هي النقطة المحورية لكثيرٍ من المنتجات، والتي كانت تعتمد بصورة أكثر على المصادر المتجددة، في ضوء قابليتها للتحلل الحيوي الذاتي. ومن هذه التطبيقات، على سبيل المثال، المواد الكيميائية التي من شبه المؤكد أن تنتهي في البيئة، مثل زيوت التشحيم لمناشير الأشجار والآلات الزراعية، والمنظفات، ...إلخ. ولقد تمكنت بالفعل المنظفات الخضراء مثل الألكيل بولي جلوكوسيدات من الحصول على حصةٍ سوقية كبيرة، وهي مصنوعة بالكامل من الموارد المتجددة (كحولات الأحماض الدهنية، وسكر الجلوكوز).

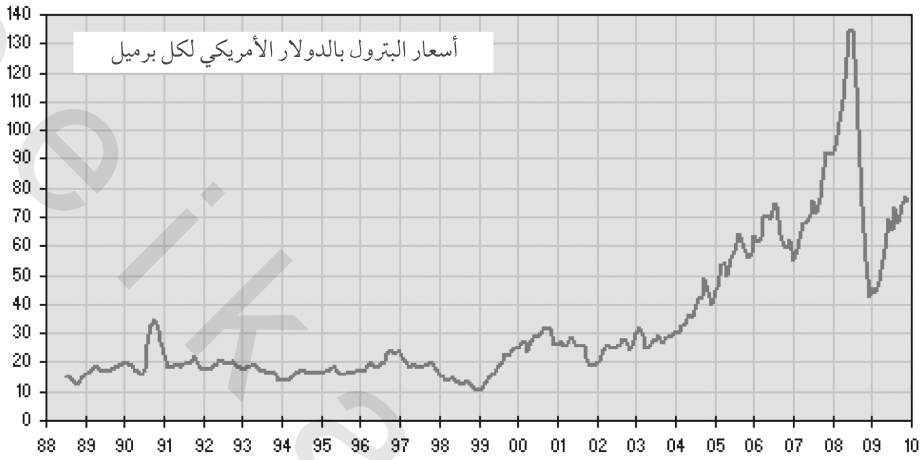
إن احتياطيات العالم من النفط الخام لن تستمر إلى الأبد [١٣، ١٤]. وفيما يتعلق باحتياطيات الوقود الحفري، فإننا نواجه حالياً بالوضع المتناقض التالي، ففي حين يتم استهلاك النفط الخام (البترول) بطريقة أسرع من أي وقت مضى، فإن "احتياطيات النفط المؤكدة" ظلت على المستوى نفسه تقريباً لمدة ٣٠ عاماً؛ وذلك نتيجة للاكتشافات النفطية الجديدة. ومع ذلك، فإن هذه "الاحتياطات النفطية المؤكدة" توجد في أماكن تتزايد صعوبة الوصول إليها. لهذا السبب، ترتفع تكاليف النفط الخام باستمرار، مما ينعكس على زيادة أسعار النفط. وفي تناقضٍ حاد لهذا، فإن المواد الخام الزراعية مثل: القمح والذرة أصبحت أرخص بشكلٍ أساسي؛ نتيجة لارتفاع الإنتاجية الزراعية. ومن الأرجح أن يستمر هذا الاتجاه لبعض الوقت، أيضاً؛ وذلك نتيجةً للإنجازات الموجودة في مجال التقنية الحيوية "الخضراء". ومن الممكن أن يرتبك هذا الاتجاه على المدى الطويل؛ بسبب الآثار العابرة لتوازنات السوق والسياسة، ولكن بالنسبة لعدد متزايد من التطبيقات فإن التوازن الاقتصادي يتجه نحو استخدام الموارد المتجددة، بما في ذلك الجزء الخاص بالمواد الكيميائية الضخمة (غير المكلفة).

على أساس الوزن، فإن الموارد المتجددة تقل في التكلفة بحوالي ٥٠٪ عن الموارد الحفرية (الجدول رقم ١). وحتى المنتجات الزراعية الثانوية مثل القش فإنها أقل ١٠ مرات تكلفة من البترول. ومن اللافت للنظر أيضاً أن أسعار السوق العالمية الحالية للنفط والسكر هي تقريباً متساوية، على الرغم من حقيقة أن السكر هو منتج نقي جداً ومكرر (٩٩,٨٪)، أما البترول فهو منتج خام غير مكرر يتألف من خليط معقد جداً من المواد الهيدروكربونية والمركبات الأخرى. أما على أساس الطاقة، فبما أن المصادر المتجددة تحتوي على حوالي نصف محتوى الطاقة الموجود في الموارد الحفرية، فإن المصادر المتجددة والوقود الحفري متساويان تقريباً في الأسعار.

الجدول رقم (١). متوسط سعر السوق العالمية لبعض المصادر الحفرية والمتجددة.

المصادر الحفرية	السعر (يورو/ طن)	المصادر المتجددة	السعر (يورو/ طن)
البترول	٣٨٠	الذرة / القمح	١٢٠
الفحم	٤٠	القش	٢٠
الإيثيلين	٨٠٠	السكر	٤٠٠

بنهاية عام ٢٠٠٩م، كان سعر النفط حوالي ٧٥ دولاراً للبرميل أي ٣٨٠ يورو للطن، وهو ما يعادل ثلاثة أضعاف سعر السلع الزراعية مثل القمح أو الذرة (حوالي ١٢٠ يورو للطن). وقد بات من الواضح بشكل متزايد أننا سوف نواجه على المدى البعيد بزيادة عالية في أسعار النفط بدلاً من التأثير الانتقالي (الشكل رقم ١)، وأنه من الواضح أن استخدام المواد الخام المتجددة له إمكانات نمو كبيرة.



الشكل رقم (١). أسعار البترول الخام من ١٩٨٨–٢٠١٠م. حقوق النسخ oilenergy.com.

مصادر أولية متجددة للصناعة الكيميائية Renewable Raw Materials for the Chemical Industry

تستند المواد الخام المتجددة أساساً على استخدام "الكتلة الحيوية"، وهي مجموع كل المواد المكونة للعالم الحي. وقاعدتها الأساسية هي نمو وإنتاج النبات، والذي يستمد طاقته من عملية التمثيل الضوئي، وربما خلال الخطوة الوسيطة للإنتاج الحيواني، مما يؤدي إلى مجموعة كبيرة ومتنوعة من الكتلة الحيوية المتاحة.

ويقدر إجمالي إنتاج الكتلة الحيوية السنوي لكوكبنا بنحو ١٧٠ مليار طن، ويتكون من ما يقرب من ٧٥٪ من الكربوهيدرات (السكريات)، ٢٠٪ اللجنين، ٥٪ مواد أخرى مثل الزيوت والدهون والبروتينات والتربينات، القلويدات، ...إلخ [١٤]. ويستخدم حالياً ٦ مليارات طن (٥ ,٣٪) من هذا الإنتاج لتلبية الاحتياجات البشرية، موزعة على النحو التالي:

- ٣ ,٧ مليار طن (٦٢٪) للاستخدام في غذاء الإنسان، ربما من خلال خطوة وسيطة عن طريق تربية الحيوان.
- ٢ مليار طن من الأخشاب (٣٣٪) لإنتاج الطاقة، والورق، واحتياجات البناء.
- ٣٠٠ مليون طن (٥٪) لتلبية الاحتياجات الإنسانية للمواد الخام التقنية، غير الغذائية (الملابس والمنظفات والمواد الكيميائية، ...إلخ).

ويستخدم باقي الكتلة الحيوية المنتجة في الأنظمة البيئية الطبيعية (علف للحيوانات البرية)، ويفقد عند استخدام البشر للكتلة الحيوية (وخاصة عن طريق الحرق)، أو يفقد؛ نتيجة عمليات التمعدن الطبيعية.

والمواد الخام المتجددة التي ذكرت هنا توفرها تقريباً الزراعة والغابات بصورة كلية. كما يساهم أيضاً قطاعا تربية الحيوان ومصايد الأسماك (في المقام الأول الدهون الحيوانية)، ولكن بصورة أقل أهمية من حيث الحجم وكذلك كفاءة التحويل المنخفضة من النبات إلى الحيوان (حوالي ١٠-٢٥٪).

ويمكن استخدام الكثير من التقنيات المختلفة لتحويل الكتلة الحيوية المتوفرة صناعيا إلى مواد خام متجددة أو ناقلات للطاقة. وغالباً ما يكون هذا النشاط الصناعي مرتبطاً أو متصلاً بقطاع الأغذية في ضوء الواقع أن مكونات الغذاء والمواد الخام المتجددة للاستخدام التقني يمكن أن تصنع في المصنع نفسه، ومن نفس المواد الزراعية الخام. فعلى سبيل المثال، يتم إنتاج السكر أو الجلوكوز لغذاء الإنسان وهو كذلك أحد أهم المواد الخام لعمليات التخمير الصناعية.

والقطاعات الصناعية التالية توفر أهم المواد الخام المتجددة في الوقت الحاضر:

- قطاع السكر والنشا: ينتج الكربوهيدرات مثل السكر والجلوكوز والنشا والدبس المتخلف من صناعة السكر، من المواد النباتية الخام مثل بنجر السكر وقصب السكر والقمح والذرة والبطاطس والكسافا الحلوة والأرز، وغيرها.
- قطاع الزيوت ومعاملة الدهون: ينتج الكثير من الكيماويات الزيتية الوسيطة مثل الشحوم الثلاثية والأحماض الدهنية والكحولات الدهنية والجليسرول من المواد النباتية الخام مثل بذور العنب، وفول الصويا وزيت النخيل وجوز الهند، والدهون الحيوانية.
- قطاع معاملة الخشب، لا سيما صناعة السيليولوز والورق: ينتج بالدرجة الأولى السليلوز والورق واللجنين من الخشب.

وتتعامل هذه الصناعات مع المواد الخام النباتية من أجل تحليلها في مكونات منفصلة مثل السكر والنشا والجلوكوز والسيليولوز والبروتينات والزيوت، واللجنين. وهي تستخدم دعامتين تقنيتين:

- تقنية التجزئة: تعتمد هذه التقنية في المقام الأول على طرق فصل فيزيائية وكيميائية لفصل المواد الخام الزراعية لمكونات منفصلة.
- تقنية إنزيمية: تستعمل هذه التقنية خلال تحويل المواد الخام الزراعية. عملياً، يتم استخدام الإنزيمات المحللة بصورةٍ أساسية، على سبيل المثال الأميليز، الذي يحلل النشا إلى جلوكوز.

وعلى الرغم من أن هذه التقنيات مختلفة بشكل واضح جداً في الطبيعة، فإن التفاعل بينهما ضروري للنجاح. فعلى سبيل المثال، تتأثر تقنية التجزئة بقوة باستخدام الإنزيمات المحللة.

ويتم تحويل المنتجات النقية الأساسية التي تم الحصول عليها (السكر والنشا والسيليولوز، والزيوت) إلى مجال واسع جداً من المنتجات، عن طريق استخدام عمليات فيزيائية وكيميائية وتقنية حيوية. فعلى سبيل المثال، يتم تحوير النشا والسليلوز كيميائياً إلى مشتقات تستخدم بصورة كبيرة في حياتنا اليومية. كما تقترن السكريات مثل السكروز والجلوكوز كيميائيا بالكيماويات الزيتية للحصول على المنظفات والمستحلبات.

وفيما يتعلق بعمليات التقنية الحيوية الصناعية، فإنه يجب ذكر تقنيات التخمير على وجه التحديد. تستخدم هذه التقنية المهمة جداً الكائنات الحية الدقيقة (البكتيريا والخمائر، والطحالب الدقيقة والفطريات) لتحويل المواد الخام الأساسية مثل السكريات والزيوت إلى مجال غير محدود تقريباً من المنتجات. ويمكن عن طريق استخدام بسيط لكائن آخر تحويل المادة الخام (على سبيل المثال السكر) إلى منتجات مختلفة تماماً، تتراوح من المنتجات ذات التركيب الكيميائي القريب جداً من المادة الخام (على سبيل المثال، حامض الجلوكونيك من الجلوكوز) إلى المنتجات التي لا تشترك عملياً في شيء مع المادة الخام البادئة (على سبيل المثال، المضادات الحيوية، والإنزيمات، ...إلخ).

الجدول رقم (٢). أرقام الإنتاج العالمي وأسعار السوق العالمية الإرشادية لعدد من المواد الخام المتجددة والبتروكيماويات.

المصادر	الإنتاج العالمي (مليون طن/ العام)	سعر السوق العالمي (يورو/ طن)
المصادر الخام المتجددة:		
السيليولوز	٣٢٠	٥٠٠
السكر	١٤٠	٢٥٠
النشا	٥٥	٢٥٠
الجلوكوز	٣٠	٣٠٠
الكحول الإيثيلي الحيوي	٣٨	٤٠٠
حمض الجلوتاميك	١	١٥٠٠
البتروكيماويات:		
الإيثيلين	٨٥	٥٠٠
البروبيلين	٤٥	٣٥٠
البنزين	٢٣	٤٠٠
حمض التيرفثاليك	١٢	٧٠٠
أيزوبروبانول	٢	٧٠٠
كابرولاكتام	٣	٢٠٠٠

وتحتاج هذه السلسلة الكاملة من الخطوات المختلفة إلى استخدام تقنيات مختلفة جداً، وغالباً ما تكون في المصنع نفسه أو المجمع الصناعي. وهذه ما يشار إليها بالـ"المصافي الحيوية"، مشابهةً لمصافي البتروكيماويات والنفط الخام.

وللتوجيه، يوضح الجدول رقم (٢) أرقام الإنتاج العالمي وأسعار السوق العالمية الإرشادية لعدد من المواد الخام المتجددة والبتروكيماويات. وتبين المقارنة بوضوح أن الأحجام والأسعار قابلة للمقارنة تماماً.

العمليات الحيوية في التقنية الحيوية الصناعية Bioprocesses in Industrial Biotechnology

عمليات التخمير Fermentation Processes

تستخدم التقنية الحيوية الصناعية لإنتاج تشكيلة واسعة من الكيماويات الدقيقة والضخمة مثل الكحول، وحامض اللاكتيك، وحامض الستريك والفيتامينات والأحماض الأمينية، والمذيبات، والمضادات الحيوية، البوليمرات الحيوية، والمبيدات الحيوية، والإنزيمات الصناعية، والملونات الحيوية، والمستحلبات، والمواد الحيوية المقللة للتوتر السطحي، والقلويدات والستيرويدات، ...إلخ. ويعدُّ التخمير الصناعي هو التقنية الرئيسة هنا، حيث تزرع الكائنات الدقيقة (البكتيريا والخمائر والفطريات) التي تحول السكريات إلى منتجات مفيدة. وهذه هي طريقة الإنتاج الصناعية الوحيدة للعديد من هذه المنتجات، وبعضهم ينتج في كميات جيدة [٣، ٤، ١٢]. ويوضح الجدول رقم (٣) أرقام الإنتاج والأسعار لعدد من منتجات التخمير. ويمتد المجال من المنتجات الضخمة غير المكلفة إلى المنتجات الدقيقة باهظة الثمن.

بفضل تكنولوجيا الحمض النووي المؤتلف أو المعدل، يمكن للمرء الآن التدخل بصفة خاصة في المادة الوراثية لهذه الكائنات الدقيقة. ومن ناحية، يمكن تعديل عمليات أيض الكائنات الدقيقة أو حتى تغييرها بصورةٍ كاملة (المعروف بهندسة الأيض)، ومن الناحية الأخرى، يمكن إدخال جينات من كائنات أرقي (النباتات والحيوانات) أو كائنات دقيقة أخرى (الخميرة والبكتيريا والفيروسات، والطحالب) إلى الكائنات الدقيقة الصناعية، ومن ثم يحدث تعبير لهذه الجينات. وهكذا يمكن إنتاج منتجات جينية جديدة بصفة مباشرة، أو إدخال مسارات أيضية جديدة لإنتاج مواد كيميائية ذات كفاءة عالية عبر عمليات التخمير الصناعية.

وعملياً، فإنه تستخدم كائنات منتجة معروفة وغير مؤذية، والتي عند تجهيزها بالمعلومات الوراثية الجديدة سوف تنتج المنتجات الكيميائية المطلوبة بإنتاجية وكفاءة عالية. والميزة الرئيسة هي أن هذه الكائنات الدقيقة المعدلة وراثياً تقوم بعملها تحت ظروف يتم التحكم فيها في المخمر أو المفاعل الحيوي، وهي موجودة ومعزولة بعناية عن العالم الخارجي. ولا يمكنها الهرب من المصنع، وعليه يتم تجنب المشكلات والهموم البيئية فيما يتعلق بإطلاق الكائنات الحية المعدلة وراثياً إلى البيئة.

الجدول رقم (٣). أرقام الإنتاج العالمي والأسعار لعدد من منتجات التخمير.

المنتج	الإنتاج العالمي (طن/ العام)	سعر السوق العالمي (يورو/ كيلوجرام)
الكحول الإيثيلي الحيوي	٥٠,٠٠٠,٠٠٠	٠,٤
حمض الجلوتاميك (MSG)	١,٥٠٠,٠٠٠	١,٥
حمض السيتريك	١,٥٠٠,٠٠٠	٠,٨
الليسين	٨٠٠,٠٠٠	١,٥
حمض اللاكتيك	٢٥٠,٠٠٠	١,٥
فيتامين ج	٨٠,٠٠٠	٨
حمض الجلوكونيك	٥٠,٠٠٠	١,٥
المضادات الحيوية (منتجات ضخمة)	٣٠,٠٠٠	١٥٠
المضادات الحيوية (متخصصة)	٥,٠٠٠	١٥٠٠
الزانسان	٢٠,٠٠٠	٨
هيدروكسي فينيل ألانين	١٠,٠٠٠	١٠
ديكستران	٢٠٠	٨٠
فيتامين ب١٢	٣	٢٥٠٠٠

العمليات الإنزيمية وتقنية الإنزيمات Enzymatic Processes and Enzyme Technology

إن الإنزيمات هي بروتينات حفزية نشطة نشأت وتطورت على مدى مليارات السنين. وبوصفها محفزات متخصصة جداً وفعالة، إلا أنها توجه كيمياء الحياة دون الحاجة إلى درجات حرارة أو ضغوط عالية، أو ظروف التآكل، والتي غالباً ما تكون مطلوبة في عمليات التخليق الكيميائية. والإنزيمات هي آلية العالم الحي، وتستخدم لخصائصها المدهشة بشكل متزايد في التطبيقات الصناعية. ويعرف هذا المجال بالتحفيز الحيوي أو البيولوجي [١٥].

وأصبحت الإنزيمات مهمة جداً في مجموعة واسعة من القطاعات الصناعية لإجراء التفاعلات التحفيزية الحيوية. وعادةً ما تستخدم الإنزيمات الميكروبية، والتي تنتج بعمليات التخمير السابق ذكرها. وتتيح التقنيات الجديدة لهندسة الإنزيمات مثل التطور الموجه تفصيل الإنزيمات الجديدة، في حين توسع تقنيات الوراثة الجديدة بصورة كبيرة مجال الإنزيمات الطبيعية التي يمكن اكتشافها. ويمكن لهذه التطورات أن تحسن كثيراً من هذه التقنية أو حتى توسيعها لتشمل تطبيقات جديدة بصفة كلية.

يعدُّ استخدام الإنزيمات في قطاع النشا على المستوى الكبير من التطبيقات التقليدية، وليس من قبيل الصدفة أنه القطاع الذي يعدُّ مصدراً للجلوكوز، والذي يعد بدوره واحداً من أهم المواد الخام المتجددة. والإنزيم الأساسي

هو إنزيم ألفا-أميليز، وهو إنزيم يتحمل درجات الحرارة ويستخدم لتحليل النشا عند درجة حرارة ١٠٥ درجة مئوية. وتتيح مثل هذه الإنزيمات المتحملة للحرارة للتفاعلات الحيوية أن تتم في درجات الحرارة العالية، ومن ثمَّ زيادة معدل التفاعل إلى حد كبير. وإنزيم مصاوغة الجلوكوز هو إنزيم آخر مهم في هذا القطاع. ويحول هذا الإنزيم الجلوكوز إلى سكر الفواكه (الفركتوز). وهو يستخدم في صورة محملة أو مقيدة ويحافظ على نشاطه الحفزي حتى سنتين عند استخدامه صناعياً. ويتجاوز الإنتاج العالمي من شراب الفركتوز والجلوكوز باستخدام هذا الإنزيم ١٥ مليون طن سنوياً.

وقطاع المنظفات هو مجال آخر وكبير للإنزيمات. وهنا تستخدم إنزيمات البروتييز والليبيز لتكسير البروتينات وبقع الدهون على الملابس.

وتمثل صناعة العلف الحيواني سوقاً مهماً أيضاً. فعلى سبيل المثال، يستخدم إنزيم الفيتيز من فطر الأسبرجلس نيجر لتحرير مجموعة الفوسفات من حمض الفيتيك في أعلاف الحيوانات، مما يحد من الحاجة لإضافة الفوسفات، وهذا له فوائد بيئية جيدة. كما تستخدم إنزيمات أخرى لتحسين تحويل الغذاء بصورة كبيرة، مع استفادة بيئية إيجابية.

وتتغلغل الإنزيمات بشكلٍ متزايد في الصناعة الكيميائية لتحفيز تفاعلات عديدة. وهنا تكون تخصصية التفاعل الإنزيمي مهمة جداً. وعند المقارنة مع المحفزات الكيميائية التقليدية، غالباً ما تكون التخصصية عالية جداً. وبالإضافة إلى الدرجة العالية من تخصصية التفاعل، فقد حفز التركيب الفراغي (Chirality) أيضاً استخدام المحفزات الحيوية في الصناعة الكيميائية. ويتطور استخدام الإنزيمات (بصورة حرة أو محملة أو مقيدة) في تفاعلات عضوية كيميائية خاصة جداً بشكل سريع جداً. وهذه عادة ما تكون في معظمها تفاعلات ذات خطوة واحدة، وتتم بكفاءة وتخصصية عالية وبمعدل تفاعل عالي. وعادة ما يشار إلى هذا المجال العلمي بالتحفيز الحيوي أو البيولوجي، وتوصف العمليات المستخدمة بالتحويلات الحيوية. وتتم هذه التحويلات الحيوية عادة في درجات حرارة عادية وضغط طبيعي، وعليه لا تكون هناك حاجة إلى أي منتجات وسيطة كي لا يتم إنتاج المخلفات الخطرة. وعادة تتم التفاعلات في مذيبات خضراء مثل الماء، والإيثانول، أو ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج، على الرغم من أن الإنزيمات تنشط أيضاً في المذيبات الكيميائية "التقليدية" مثل الميثانول، والأسيتون، والمذيبات المكلورة، ...إلخ. وينبغي أيضاً الإشارة إلى أن الإنزيمات المستخدمة في التقنية الحيوية الصناعية والتحفيز الحيوي تنتج عملياً من الكائنات الدقيقة عن طريق التخمير. وتمثل الإنزيمات الصناعية ٢ مليار دولار في قطاع التقنية الحيوية الصناعية [٤، ١٦].

المزايا الاقتصادية والبيئية للتقنية الحيوية الصناعية

Economical and Ecological Advantages of Industrial Biotechnology

غالباً ما يؤدي إدخال خطوات عملية التقنية الحيوية في التخليقات الكيميائية إلى فوائد بيئية كبيرة، مثل الخفض الواضح في المخلفات، وانخفاض متطلبات الطاقة، وانخفاض استخدام المذيبات، ومنع المنتجات

الوسيطة الخطرة، ...إلخ. ولكن هذه المزايا البيئية عادة ليست هي السبب لتبديل التقنية. فدائماً ما تتمثل القوة الدافعة وراء مثل هذا القرار في تحسينات العملية التقنية وخفض التكاليف المصاحبة، والمزايا البيئية تكون هي آثاراً جانبية جذابة، وليست كافية في حد ذاتها لتحفيز متخذي القرار لإدخال تقنية جديدة (مع مخاطر الفشل المرتبطة). والطريقة التي تجمع بها التقنية الحيوية الصناعية ما بين التطور الاقتصادي والبيئي هي نموذجية تماماً: حيث تؤدي زيادة الكفاءة وانخفاض تكاليف الإنتاج لمثل هذه العمليات التقنية الحيوية دائماً إلى تأثير بيئي منخفض بشكل كبير وتؤدي عموماً إلى تحسين القدرة التنافسية.

ففي تقرير صادر من قبل منظمة التعاون والتنمية في عام ٢٠٠١م، قدمت ٢١ دراسة حالة [١٧]، بينت كل منها بشكل مقنع المزايا الاقتصادية والبيئية التي تقدمها التقنية الحيوية الصناعية. ويجب أن يشار إلى أنه في معظم الحالات فإن العمليات التي وصفتها قد تم تنفيذها في الصناعة الفعلية وبقدرة تنافسية، وبشكلٍ قاطع غير مقصورة على الدراسات النظرية أو المشاريع البحثية.

التغيرات المتوقعة في المجتمع والتقنية Expected Changes in Society and Technology

من المتوقع حدوث الكثير من التغييرات في المجتمع والتقنية على حد سواء في السنوات المقبلة والتي قد تعدل بجدية النظام الحالي. وباعتراف الجميع، فإن هذه التغييرات من المرجح أن تتحقق تدريجياً، ولكن، مع ذلك، من الممكن أن تحدث بعض "الصدمات الحقيقية". وإذا أردنا التغلب على هذه التغييرات، فإن الأساس التقني لمجتمعنا يجب أن يتغير جذرياً.

التغيرات في توريد المواد الخام الأولية Changes in the Supply of Primary Raw Materials

تعتمد معظم المواد الكيميائية العضوية في الوقت الراهن على المصادر البتروكيماوية، كما يتم توفير احتياجاتنا من الطاقة إلى حدٍ كبير من الوقود الحفري مثل الفحم، والنفط، والغاز الطبيعي. ويرجع هذا أساساً نتيجة لانخفاض أسعار المصادر البتروكيماوية بصورة كبيرة في الماضي. ولكن احتياطات العالم من النفط الخام لن تستمر إلى الأبد. وتواجه الآن زيادة الطلب على النفط الخام؛ نتيجة تزايد عدد سكان العالم بمعدل إنتاج ثابت. وعلى الرغم من بقاء احتياطيات النفط المعروفة على المستوى نفسه تقريباً لمدة ٣٠ عاماً نتيجة لاكتشافات النفط الجديدة، فإن هذه الاحتياطيات النفطية تقع على نحو متزايد في أماكن يصعب الوصول إليها. ولذلك فإن تكاليف استخراج النفط الخام ترتفع بشكل مستمر، كما انعكس على زيادة أسعار النفط.

وفي تناقض حاد لذلك، فإن أسعار المواد الخام الزراعية المنتجة محلياً مثل القمح والذرة تتضاءل باستمرار نتيجة أساسية لزيادة الغلة الزراعية، مما يؤدي تدريجياً إلى تحول التوازن الاقتصادي تجاه استخدام الموارد المتجددة. ومن الأرجح أن يستمر هذا الاتجاه لبعض الوقت.

حالياً، وعلى أساس الوزن، فإن الموارد الحفرية تكون أكثر تكلفة من الموارد المتجددة المماثلة مثل الذرة بحوالي مرتين إلى ثلاث مرات. في حين أن المنتجات الزراعية الثانوية، مثل القش يكون أرخص ١٠ مرات من البترول. وعليه فإن الموارد المتجددة تقدم مصدراً محتملاً بوصفها مادة خام لكل من احتياجاتنا الكيميائية واحتياجاتنا من الطاقة (الوقود الحيوي)، وذلك لأسباب تتعلق بالتكلفة والاكتفاء الذاتي، والتنمية المستدامة، والحفاظ على الموارد الطبيعية [٥، ١٨، ١٩]. ولكن، لاتزال تقنيات التحويل الفعال لهذه الموارد المتجددة إلى منتجات مفيدة عائقاً كبيراً، وفي هذا الصدد فإن التقنية الحيوية الصناعية هي التقنية الرئيسة. ففي حين أن العمليات الكيميائية التقليدية قد وصلت إلى درجة عالية من النضج التقني والكفاءة في استخدام الموارد الحفرية، فإن هذه العمليات تجد صعوبات جدية في استخدام المواد الخام المتجددة. وعلى النقيض، فإن عمليات التقنية الحيوية الصناعية يمكن أن تتعامل مع هذه الموارد المتجددة بسهولة مذهلة، إذ إن الكائنات الدقيقة لا تجد صعوبة في تحويل المواد الخام، على سبيل المثال الكربوهيدرات إلى تشكيلة واسعة من المنتجات المفيدة. وعلى هذا فإن التقنية الحيوية الصناعية هي تقنية أساسية، وتحتاج إلى تطوير للانتقال من مجتمعنا الحاضر القائم على الوقود الحفري إلى مجتمع مستقبلي قائم على المنتجات الحيوية المستدامة.

الطلب المتزايد للزيادة السكانية على المواد الخام والطاقة

Increased Demand of a Growing Population for Raw Materials and Energy

يستخدم حالياً حوالي ٢٠٪ من سكان العالم ما يقرب من ٨٠٪ من جميع المواد الخام والطاقة المتاحة. وبطبيعة الحال، يمكن توقع أن الـ ٨٠٪ الآخرون من سكان العالم سوف يفعلون كل شيء ممكن لتحسين مستويات معيشتهم، وعليه سوف يتطلبون مواد خام وطاقة أكثر بكثير من قبل. أيضاً، لا ينبغي أن ننسى أن عدد سكان العالم ينمو بمعدل منذر. ولن يؤثر "خفض معدل النمو السكاني"، والذي عادة ما يستشهد به ويفسر بصورة خاطئة، سوى في أجيال قليلة في أقرب وقت ممكن، وهي عاقبة مؤسفة لخصوصيات ديناميكية النمو السكاني. وفي الوقت الحاضر، فإن عدد سكان العالم لا يزال ينمو بمعدل أسرع من أي وقت مضى. فعلى وجه الخصوص، يجب أن تؤخذ ديناميكيات النمو في الصين والهند بعين الاعتبار، في ضوء حقيقة أن هذه الدول الغنية بالسكان من المتوقع أن تحسن مستويات المعيشة في المدى القصير.

كل هذه الآثار سوف تؤدي حتماً إلى زيادة كبيرة في الطلب على المواد الخام والطاقة. ومن غير المرجح حدوث توزيع عادل للمواد الخام المتاحة، مما يؤدي في نهاية المطاف إلى زيادة استخدام المواد الخام على الصعيد العالمي بصورة أكثر. وسوف يؤدي هذا إلى استنزاف الاحتياطات الحفرية المتبقية وغيرها من المواد الخام بصورة أسرع، مما يجلب المواد الخام المتجددة والطاقة والمواد الخام إلى صدارة الاهتمام.

الطلب المتزايد للكفاءة في أنظمة إنتاج المواد الكيميائية

Increased Demand for Efficiency in Chemical Production Systems

تتصارع قوانين اقتصاد السوق لتحسين كفاءة نظم الإنتاج باستمرار. ففي الماضي بقيت نظم الإنتاج التي تنتج كميات كبيرة من النفايات اقتصادية، إما لأن هذه النفايات يمكن تفريغها في البيئة وإما أن تكلفة التنظيف تم تحميلها على المجتمع. أما في الوقت الحاضر، فإن مبدأ "الملوث يدفع" يعني أن هذه العمليات أصبحت محكوماً عليها بالفشل. فالنفايات تكلف الأموال، وذلك للتخلص منها، كما أنها تمثل خسارة للعائد مع جميع التكاليف الإضافية المرتبطة بها. وعليه، هناك حاجة إلى درجة عالية من الكفاءة والأداء لجميع العمليات الكيميائية حالياً. وتتسم طرق التحفيز الحيوية بالكفاءة والتخصصية، مما ينتج عنه نفايات أقل، واستخدام أقل للمواد الخام، واستهلاك أقل للطاقة. ودائماً ما يكون الدافع وراء تغلغل التقنية الحيوية الصناعية في صناعة الكيماويات تقريباً هو المبادئ الاقتصادية الطبيعية مثل تحقيق وفورات في التكلفة، وزيادة الكفاءة، ...إلخ.

وعلاوة على ذلك، حيث إنه من المتوقع أن العوامل التي نوقشت سابقاً ستؤدي حتماً إلى مزيد من زيادة الأسعار للمواد الخام والطاقة، فإن الحاجة إلى عمليات كيميائية فعالة سوف تنمو بصورة أقوى. وبدون شك فإن المزيد من تغلغل التقنية الحيوية الصناعية في صناعة الكيماويات وتعاونها التآزري مع التقنيات الكيميائية التقليدية سوف يتم تنشيطه بقوة.

تزايد الحاجة إلى الاستدامة في نظم الإنتاج Growing Need for Sustainability of the Production Systems

يواجه العالم تحديات كبيرة في تطوير عمليات إنتاج مستدامة ونظيفة، والتي تحترم البيئة، وتحسن نوعية حياتنا وتكون في الوقت نفسه قادرة على المنافسة في السوق. ويشمل هذا تطوير عمليات إنتاج جديدة والتي تقلل أو تقضي على استخدام المواد الخطرة أو السامة، وتقلل استهلاك الطاقة وإنتاج النفايات، وتبدأ بشكل مثالي من المواد الخام المتجددة. والتقنية الحيوية الصناعية مؤهلة بشكل جيد لتؤدي دوراً رئيساً في هذا المسعى لتحقيق الاستدامة. وتنتج العمليات الحيوية عموما نفايات أقل، ويمكن في بعض الأحيان الاستغناء عن استخدام المواد الكيميائية السامة والخطرة تماماً عن طريق استخدام إنزيم. وبصفة عامة، تؤدي التقنية الحيوية الصناعية عادة إلى انخفاض كبير في البصمة البيئية للصناعات التحويلية.

منذ معاهدة كيوتو، تم إلزام معظم الدول الصناعية باحترام عدد من المعايير الأساسية فيما يتعلق باستخدام المواد الخام وسياسة الطاقة. وقد تعهد الكثير من الدول ببذل جهود متضافرة في إطار معاهدة كيوتو. وقد أصبحت تفاوضية حقوق انبعاث ثاني أكسيد الكربون الآن حقيقة، وسوف يتم قريباً تفعيل العقوبات الأولى لتعدي الحدود المسموحة. ومن المتوقع أن يؤدي ذلك إلى تغيير أساسي في مفهوم استخدام المواد الخام واستهلاك الطاقة. فمن الواضح أن المواد الخام المتجددة والتي تكون محايدة بالنسبة لثاني أكسيد الكربون، مثل الكتلة الحيوية، سوف تستفيد من هذا التطور.

تغيير مفاهيم وسلوك المستهلكين Changing Consumer Perceptions and Behavior

في معظم المجتمعات الأكثر تقدماً، هناك طلب متزايد من المستهلكين للحصول على معلومات حول المنتجات التي يشترونها، وهذا أبعد من الجودة والسعر. ففي أيامنا هذه، تهتم شريحة متنامية من المستهلكين بنظم الإنتاج التي تستخدم لإنتاج منتجاتهم (مثل الزراعة العضوية، والرفق بالحيوان، ...إلخ)، وكذلك حول ما يحدث معها بعد استخدامها (النفايات، والتحلل، ...إلخ). ويجري رفض نظم الإنتاج التي تسبب أضراراً بيئية أو معاناة للحيوان أو التي تعتمد على تجارة غير منصفة أو مستغلة (مثل عمالة الأطفال) ...إلخ، على نحو متزايد من قبل المستهلكين، حتى لو حدثت هذه العمليات بعيداً أو لم تسبب لهم عبء أو ضرر بصورة مباشرة. ويبحث المستهلكون عن السلع والخدمات التي يتم الحصول عليها واستخدامها في ظل ظروف اجتماعية واقتصادية مقبولة، ولا تثير أية اعتراضات أخلاقية أو عاطفية.

ورفض الجمهور الأوروبي للمحاصيل المعدلة وراثياً هو من هذا النوع. ومن المفارقات أن المستهلكين الذين يرفضون المحاصيل وراثياً المعدلة هم بالضبط في كثير من الأحيان المستهلكين نفسهم الذين يستخدمون وبدون تذمر، حتى بصورة حماسية، منتجات مصنوعة من خلال عمليات التخمر، مثل منتجات تخمير اللبن أو الكورون (Quorn)، وهو بروتين من الفطريات. كما أن إدراك المستهلك للمنتجات الكيميائية في الأطعمة (المواد الحافظة والملونات، ومضادات الأكسدة) هو أيضاً سلبي للغاية، وتكون البدائل الطبيعية مطلوبة. ولهذا السبب فإن يمكن توقع زيادة استبدال هذه المنتجات "الكيميائية" بمنتجات التقنية الحيوية الصناعية.

التقنية الحيوية الصناعية لديها القدرة على أن ينظر إليها على أنها تعمل بالتنسيق مع الطبيعة. ويحب الناس عموماً فكرة استخدام الكتلة الحيوية بدلاً من العمليات النفطية، والعمليات الحيوية بدلاً من عمليات التخليق التقليدي. وهكذا فإن العمليات الحيوية ليست فقط ذات قدرة تنافسية من حيث التكلفة وذات فوائد بيئية، ولكن لها أيضاً ميزة قبول الجمهور مقارنة بالعمليات الكلاسيكية. وعلاوة على ذلك فإن التقنية الحيوية الصناعية وعملياتها تتم دائماً في أنظمة إنتاج مغلقة وتستعمل الكائنات الدقيقة غير المؤذية، التي لا يمكن لها البقاء على قيد الحياة في الطبيعة.

التغيرات في الأنظمة الزراعية Changes in the Agricultural Systems

من الواضح أن القطاع الزراعي سيحتاج أن يتكيف بصورة مستمرة مع الاحتياجات والمشكلات الجديدة تحت ضغط المستهلكين، والحكومات، فضلاً عن القوي الأجنبية التي ترغب في تخفيض القيود المفروضة على الاستيراد [٢٠]. لا سيما في أوروبا، فإن توسع الاتحاد الأوروبي مع عدد كبير من الأعضاء الجدد من أوروبا الشرقية سوف يؤدي إلى وضع الكثير من الضغوط الإضافية على النظام.

ويمكن تمييز بعض المبادئ التوجيهية للتغيير بوضوح. فما نحن بحاجة إليه هو:

- الزراعة الأقل توجهاً نحو الإنتاج الكمي، ولكن موجهة بصورة أكثر نحو المنتجات الزراعية ذات الجودة العالية.
- الزراعة مع المزيد من الاحترام للبيئة.
- خفض أو إلغاء دعم المزارعين المرتبط بالإنتاج.
- خفض ضرائب الاستيراد لعدد من المنتجات الزراعية بغرض السماح للبلدان النامية بتسويق منتجاتها في أوروبا.
- مزيد من التنوع في النظم الزراعية، مثل المحاصيل الجديدة ونظم الإنتاج الجديدة، مثل الزراعة العضوية.
- تحفيز إنتاج المحاصيل الزراعية لغير الأغراض الغذائية.

ويوافق استخدام المواد الخام الزراعية كمادة خام متجددة في الصناعة الكيميائية والوقود بوضوح الكثير من التوقعات. وعليه، فإن هذه التطورات سوف يرحب بها، ولا سيما من جانب المجتمع الزراعي الذي فهم بوضوح أهمية التقنية الحيوية الصناعية.

استنتاجات ومنظورات مستقبلية Conclusions and Perspectives

يمكن للتقنية الحيوية الصناعية تصنيع مجال واسع من المواد الكيميائية باستخدام كائنات دقيقة مفيدة أو إنزيماتها. ويبدو أن الموجة الأخيرة من التطبيقات الجديدة تشير فقط إلى أن قمة جبل الجليد قد تم مسها. وقد تنبأ الميكروبيولوجي جاكسون فوستر في عام ١٩٦٤م: "لا تقلل أبداً من قوة الكائن الدقيق"، وقد ثبتت مقولته حتى الآن.

في الوقت الراهن، لا تزال بعض الصعوبات موجودة. فمن الواضح أن استبدال "اقتصاد الهيدروكربون" بـ"اقتصاد الكربوهيدرات" لن يكون سهلاً أو رخيصاً ! فبالإضافة إلى إقناع قطاع البتروكيماويات، يبقى من المهم معرفة إجمالي تكاليف الإنتاج وإعادة إنتاج واستخدام الكتلة الحيوية في التطبيقات المختلفة، قبل القيام بالاستثمارات. ويمكن أن يكون للقدرة على تثمين النفايات والكتلة الحيوية والمنتجات الثانوية من المنتجات الحيوية الأخرى في كثير من الحالات تأثير كبير على الجدوى الاقتصادية.

وتتغلل هذه التقنية التي تطورت بقوة في المجالات التقليدية لصناعة الغذاء والرعاية الصحية، بقوة إلى الصناعات الكيميائية ذات التطبيقات في مجال الكيمياء الدقيقة والضخمة، وتخليق البوليمرات، والصناعات الدوائية، وقطاع الطاقة. وحيث إن هذه العمليات والمنتجات تعتمد إلى حد كبير على المواد الخام المتجددة وتتمتع بمنافع بيئية كبيرة، فإن هذا يوفر لها ميزة كبيرة في منظور التنمية المستدامة.

obeikandl.com

ويجب على العلم والصناعة، ورجال السياسة على حد سواء أن يهتموا بهذه الكيمياء الخضراء ومنتجاتها الحيوية. ولا يتم تعريف الابتكار الناجح من منتج عملية التقنية الحيوية فقط بواسطة التقنية والعلم، ولكن، وبقدرٍ مساوٍ، بعوامل أخرى مثل القبول من جانب الجمهور العام، مناخ الابتكار، والدعم من جانب السلطات عن طريق خلال سياسة بحث وتطوير متناسقة.

المراجع References

[١] Dale, B.E. (2003) "Greening" the chemical industry: research and development priorities for biobased industrial products. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**, 1093–1103.

[٢] Soetaert, W. and Vandamme, E.J. (2006) The impact of industrial biotechnology. *Biotechnol. J.*, **1** , 756–769.

[٣] De Baets, S., Vandedrinck, S., and Vandamme, E.J. (2000) Vitamins and related biofactors: microbial production, in *Encyclopedia of Microbiology*, vol. **4**, 2nd edn (ed. Joshua Lederberg), Academic Press, San Diego, pp. 837–853 .

[٤] Demain, A.L. (2007) The business of biotechnology. *Ind. Biotechnol.*, **3**, 269–283.

[٥] Soetaert, W. and Vandamme, E.J. (eds) (2008) *Biofuels*, Wiley Series in Renewable Resources, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

[٦] Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005) Biotechnology: a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.*, **23**, 471–499.

[٧] Wilke, T. and Vorlop, K.D. (2004) Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 13–142.

[٨] Black, M. and Miller, R. (2006) Platform chemicals from crops. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 1725–1728.

[٩] Brundtland, C.G. (1987) *Our Common Future. The World Commission on Environmental Development*, Oxford University Press, Oxford.

[١٠] Vos, R.O. (2007) Defi ning sustainability: a conceptual orientation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **82**, 334–339.

[١١] Eggersdorfer, M., Meyer, J., and Eckes, P. (1992) Use of renewable resources for non-food materials. *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 355–364.

[١٢] Goldberg, I., Rokem, J.S., and Pines, D. (2006) Organic acids: old metabolites, new themes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 1601– 1611.

[١٣] Campbell, C. (1998) The future of oil. *Energy Explor. Exploit.*, **16**, 125–152.

[١٤] Okkerse, H. and Van Bekkum, H. (1999) From fossil to green. *Green Chem.*, 107–114.

[١٥] Vandamme, E., Cerdobbel, A., and Soetaert, W. (2006) Biocatalysis on the rise. Biocatalysis on the rise: part 11. Applications. *Chem. Today*, **24**, 57–61.

[١٦] Demain, A.L. (2000) Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnol. Adv.* ,**18**, 499–514.

[١٧] Griffiths, M. (ed.) (2001) The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability, OECD report, http:// www1.oecd.org/publications/e-book/301061e.pdf.

[١٨] Wuebbles, D.J. and Jain, A.K. (2001) Concerns about climate change and the role of fossil fuel use. *Fuel Proc. Technol.*, **71**, 99–119.

[١٩] Rass-Hansen, J., Falsig, H., Jorgensen, B., and Christensen, C.H. (2007) Bioethanol: fuel or feedstock? *J. Chem.Technol. Biotechnol.*, **82**, 329–333.

[٢٠] Poincet, T. and Parris, K. (eds) (2004) Biomass and Agriculture. Sustainability, Markets and Policies, OECD report, http://www1.oecd.org /publications/e-book/5104011E.PDF.

الفصل الأول

تاريخ التقنية الحيوية الصناعية
HISTORY OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY

أرنولد ل. ديمان

Arnold L. Demain

(١ , ١) التاريخ المبكر Early History

إن ممارسة التقنية الحيوية الصناعية لها جذورها العميقة في العصور القديمة. فقد تم استخدام الكائنات الدقيقة قبل وقتٍ طويل من "اكتشافها" لتلبية احتياجات ورغبات البشر، على سبيل المثال للحفاظ على الحليب والفواكه والخضروات، وتحسين نوعية الحياة من خلال إنتاج المشروبات، والجبن، والخبز، والأطعمة المملحة، والخل. ويعود استخدام الخمائر إلى العصور القديمة. وقد استخدمت أقدم طرق التخمير في سومر وبابل في بدايات عام ٧٠٠٠ قبل الميلاد لتحويل السكر إلى الكحول بواسطة الخمائر. وفي عام ٤٠٠٠ قبل الميلاد، اكتشف المصريون أن ثاني أكسيد الكربون الناتج بفعل خميرة الخبز يمكن أن يرفع الخبز. ومن المعروف أيضاً أن الشعوب القديمة صنعت الجبن باستخدام الفطريات والبكتيريا.

واستخدام الكائنات الدقيقة في الغذاء له أيضاً تاريخ طويل. ففي عام ١٠٠ قبل الميلاد[1]، وجد في روما القديمة أكثر من ٢٥٠ مخبزاً والتي كانت تصنع الخبز المخمر. وبوصفها وسيلة من وسائل الحفظ، تم تخمير اللبن الحليب إلى حمض اللاكتيك لصناعة الزبادي، كما تم تحويله إلى الكفير والكوميس باستخدام سلالة الكليفيروميسس في آسيا. ويرجع استخدام الفطريات لتخمير الأرز في عملية إنتاج الكوجي إلى عام ٧٠٠ بعد الميلاد على الأقل. وفي القرن الرابع عشر الميلادي، شاع أسلوب تقطير المشروبات الروحية الكحولية من الحبوب المخمرة في كثيرٍ من أنحاء العالم، وإن كان يعتقد نشأته في الصين أو الشرق الأوسط. وقد بدأت صناعة الخل في نيو أورليانز، وفرنسا، في نهاية القرن الرابع عشر وتعرف التقنية السطحية المستخدمة بطريقة أورليانز.

---

(١) تم حذف ترجمة فقرة من الكتاب الأصلي؛ لمخالفتها للعقيدة الإسلامية.

obeikandl.com

وفي القرن السابع عشر، قام أنطوني فان ليوفينهويك، وهو تاجر هولندي بدون أي تدريب جامعي ولكنه هاوٍ ذو اهتمام ببناء المجاهر، بتحويل عدسته البسيطة لفحص المياه، والمواد المتحللة وكشطات من أسنانه. وهكذا سجل وجود كائنات دقيقة متحركة أقل من الألف من حجم حبة الرمل، وأطلق عليها "جزيئات حيوانية". وقد يكون عدم اتصال ليوفينهويك بالجامعة سبباً في عدم الاعتراف باكتشافاته، من قبل الجمعية الملكية في إنجلترا وأمينها، هنري أولدنبورغ، الذي كان يتراسل مع هواة العلم في أوروبا. ومن ١٦٧٣-١٧٢٣م، قام ليوفينهويك بإرسال ملاحظاته كمتخصص مجهري للجمعية في سلسلة من الخطابات.

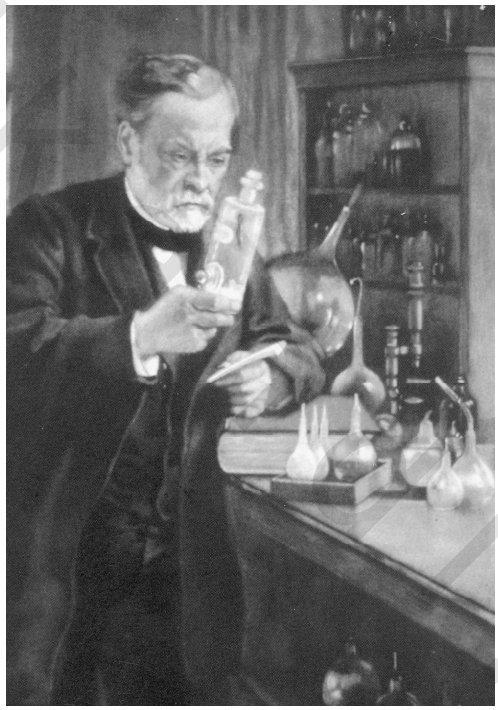
وقد اعتقد معظم العلماء في ذلك الوقت أن الميكروبات تنشأ تلقائياً من المادة غير الحية. وتبع ذلك ١٠٠ عام من النقاش حول تلقائية النشوء، والذي سمي بجدارة "بحرب حقن السوائل". وقد ادعى أنصار النظرية في وقتٍ سابق أن اليرقات تنشأ من اللحوم المتحللة، وقد نازع الطبيب الإيطالي فرانشيسكو ريدي هذه النظرية. وفي هذا الوقت، فقدت نظرية النشوء التلقائي، والتي وضعت من قبل أرسطو وآخرين، مصداقيتها فيما يتعلق بأشكال الحياة الأرقي، ولذلك ركز أنصارها حججهم على البكتيريا. وقد فسَّرت النظرية بالفعل كيفية تعكر محلول رائق عبر نمو أعدادٍ كبيرة من "الكائنات الدقيقة الناشئة تلقائياً" مع مرور الوقت. ومع ذلك، يعتقد آخرون أن الكائنات الحية الدقيقة جاءت فقط من ميكروبات موجودة سابقاً، وبأن وجودها في كل مكان في الهواء هو السبب في أنها تنمو في المحاليل العضوية بعد الوصول إلى هذه السوائل الغنية.

وفي أوائل القرن التاسع عشر، اقترح ثلاثة محققين مستقلين، تشارلز كاجنيارد دي لا تور من فرنسا، وثيودور شوان، وفريدريش تراوجوت كوتسينج من ألمانيا، أن منتجات التخمير، وعلى رأسها الإيثانول وثاني أكسيد الكربون، تنتج من قبل أشكال حياة مجهرية. وقد عارض الكيميائيون الرائدون في هذه الفترة بشدة هذا المفهوم (مثل جونز جاكوب بيرزيليوس، جوستوس فون ليبج، وفريدريش فوهلر) والذين اعتقدوا أن التخمير هو تفاعل كيميائي بحت؛ وقد اتفقوا على أن الخميرة في محاليل التخمير هي مادة متحللة وغير حية.

وكانت الكيمياء العضوية مزدهرة في ذلك الوقت، ونجح هؤلاء المعارضون لنظرية الأصول الميكروبية الحية في البداية نجاحاً كبيراً في طرح وجهات نظرهم. وقد أدى الاهتمام بآليات هذه التخميرات إلى أبحاث لويس باستور اللاحقة (الشكل رقم ١ , ١)، والتي لم تؤدِ فقط إلى تطور الميكروبيولوجي كتخصص متميز، ولكنها أدت أيضًا إلى تطوير اللقاحات ومفاهيم الصحة والنظافة، والتي أحدثت ثورة في ممارسة الطب.

وفي عام ١٨٥٠م، اكتشفت كازيمير دافيان أشكال عصوية في دم الأغنام المصابة بالجمرة الخبيثة، وكان قادراً على إحداث المرض في الأغنام السليمة من خلال حقنها أو تلقيحها بهذا الدم. وفي السنوات الـ ٢٥ التالية، هدم كل من باستور في فرنسا وجون تيندال في بريطانيا أخيراً مفهوم النشأة التلقائية، وأثبتا أن الحياة الميكروبية الموجودة جاءت من حياةٍ سابقة.

وبدأت أعمال باستور في عمله باعتباره كيميائياً يعمل على دراسة التركيب الفراغي. وفي خمسينيات القرن السابع عشر، اكتشف باستور نوعين من الكحول الأميلي، وهما الصورة (دي) و(إل)، لكنه لم يكن قادراً على الفصل بين الاثنين. ولهذا السبب بدأ بدراسة الميكروبات الحية التي تقوم بالتخمير، والتي أدت إلى استنتاجه، في عام ١٨٥٧م، بأن التخمير هي عملية حية للخميرة. وفي عام ١٨٦١م، أثبت باستور وجود الجراثيم في الهواء، مما أدى إلى التشكيك في نظرية النشأة التلقائية للميكروبات، وعند هذه النقطة تمت ولادة مفهوم ميكروبيولوجيا التخمير. ومع ذلك، استغرق الأمر ما يقرب من عقدين من الزمن، حتى عام ١٨٦١م، لدحض النظرية الكيميائية لبيرزيليوس، وليبج، وفوهلر (أي أن التخمير ينتج من الاتصال مع مواد متحللة).

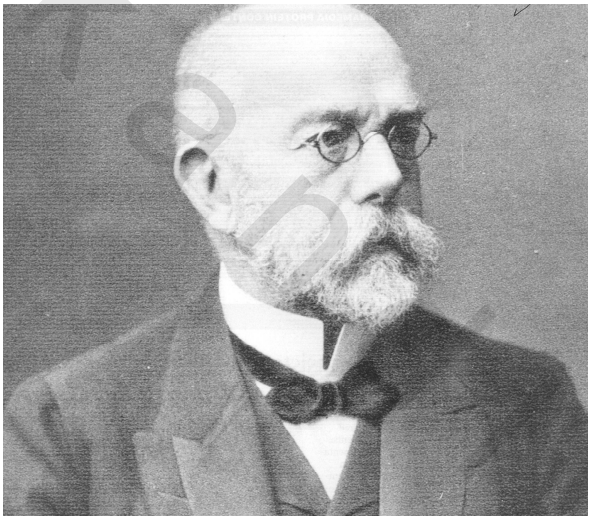


الشكل رقم (١ , ١). لويس باستور.

وفي عام ١٨٧٦م، أثبت عالم الميكروبيولوجي الألماني الكبير روبرت كوخ (الشكل رقم ٢ , ١) أن البكتيريا من عدوى مرض الجمرة الخبيثة كانت قادرة على التسبب في المرض. وقد قادت إسهاماته المنطوية على نمو الميكروبات في المزرعة النقية إلى انخفاض نظرية تعدد الأشكال، والتي افترضت أن شكل واحد من البكتيريا تطور إلى شكل آخر. ويعدُّ عمل كوخ هو الأساس الذي أدى إلى قبول فكرة أن أمراضاً معينة تنتج من كائنات محددة، لكل منها شكل خاص ووظيفة محددة. وفي عام ١٨٨٤م، تمكن طلابه جافكي ولوفلر من تأكيد الدور الممرض للبكتيريا المعدية في حمى التيفود والدفتيريا.

وقد استدعي باستور من قبل المقطرين في شركة ليلي لمعرفة لماذا تصبح محتويات براميل التخمير لديهم حامضة. وباستخدام مجهره الخاص، لاحظ أن محلول التخمير لا يحتوي فقط على خلايا الخميرة، ولكن أيضاً على البكتيريا، وكان يعرف مسبقاً أن هذه يمكن أن تنتج حامض اللاكتيك. وقد أدت هذه الملاحظة إلى اقتراحه بأنه يمكن منع هذه الحامضية باستخدام معالجة حرارية معتدلة، والتي أصبحت تعرف فيما بعد باسم "البسترة".

ومن أعظم إسهامات باستور إثبات أن كل نوع من أنواع التخمير يتم بواسطة كائن حي دقيق محدد. علاوةً على ذلك، برهن على وجود أشكال للحياة والتي كانت لاهوائية تمامًا، وذلك في دراسة أجريت لتحديد سبب تدني نوعية البيرة الفرنسية عن البيرة الألمانية. وقد أدى الاهتمام في آليات هذه التخميرات إلى الأبحاث اللاحقة من قبل باستور، والتي لم تؤدِ فقط إلى تقدم علم الميكروبيولوجي بوصفه تخصصاً متميزاً، ولكن أيضاً أدت إلى تطوير اللقاحات ومفاهيم النظافة والصحة العامة والتي أحدثت ثورة في ممارسة الطب.



الشكل رقم (٢, ١). روبرت كوخ.

ومع تأسيس نظرية الجراثيم في الأمراض عن طريق باستور وكوخ، فقد اتسم النصف الثاني من القرن التاسع عشر بمكافحة المرض، وكان اهتمام علماء الميكروبيولوجي موجهاً نحو جوانب الميكروبيولوجي المعنية بالدواء والصحة العامة. وأدى ذلك إلى اكتشاف أن جسم الإنسان له دفاعاته الخاصة في مكافحة الجراثيم المسببة للأمراض. ووجد باستور وكوخ، من بين آخرين، أنه عند الغزو بالبكتيريا تتكون بروتينات (الأجسام المضادة)، والتي يمكنها معادلة أو إزالة تأثير الكائن الغازي. وهكذا، تأسس علم المناعة. وعن طريق الحقن إما بأشكال ميتة وإما بأخرى تم إضعافها من البكتيريا المسببة للمرض، تمكن باستور من تقوية مناعة الفرد ضد المرض. واحتل إنتاج هذه اللقاحات الكثير من البحوث الأولية في الميكروبيولوجي.

وأثناء حياة باستور، تم إدخال استخدام المطهرات. وقد ثبت في عام ١٨٤٦م من قبل إيجانز سيملويس أن الكلور يمكن أن يكافح العدوى، وفي عام ١٨٦٥م، أثبت جوزيف ليستر أنه يمكن القيام بالشيء نفسه باستخدام مع حمض الكربوليك. وفي وقتٍ لاحق، استخدم بول إرليش الأصباغ الاصطناعية وأسس مفهوم "الرصاصة السحرية". وقرب نهاية القرن التاسع عشر، بدأ إيرليش في اختبار الكثير من المركبات المخلقة. وقد حقق النجاح في عام ١٩٠٩م، في علاج الحمى الانتكاسية، والزهري، وداء المثقبيات باستخدام منتج زرنيخي أطلق عليه سالفرسان أو مركب ٦٠٦؛ (لأنها كانت محاولته رقم ٦٠٦ لإنتاج مركب زرنيخي لقتل جرثومة الزهري داخل الجسم دون الإضرار بالعائل). وكان هذا هو أول علاج كيماوي يكتشف، وقد صاغ مصطلح "العلاج الكيميائي".

وقد فتح استخدام العقاقير السامة بشكلٍ انتقائي للطفيل وبدون ضرر للعائل حقلاً جديداً تماماً لعلاج أمراض الإنسان. ففي عام ١٩٢٧م، استكمل جيرهارد دوماك في ألمانيا هذا العمل [١] مع معاونيه ميتش وكلارر. وكانوا يعملون في شركة آي جي لصناعة الأصباغ، والتي كانت نتيجة لعملية اندماج في ١٩٢٤م بين شركتي باير وباسف. وقد أدى عملهم إلى تطوير المركب الأحمر "برونتوسيل الأحمر". وكان هذا المركب نشطاً في الفئران ضد البكتيريا العنقودية، ولكن الغريب أنه كان غير نشطٍ خارج الفئران في المختبر. ثم في عام ١٩٣٥م، اكتشف تريفويل وزملاؤه في فرنسا أن الصبغة الحمراء يتم تكسيرها في الحيوان إلى السلفانيلاميد عديمة اللون والمثبطة. وقد أدى هذا إلى نشأة المفهوم المهم أن المواد الكيميائية يمكن أن تقتل أو تثبط البكتيريا بدون سمية للإنسان. وعلى الرغم من أن الحكومة النازية رفضت السماح لدوماك بقبول جائزة نوبل في عام ١٩٣٩م، إلا أنه قبلها لاحقاً في عام ١٩٤٧م. وقد اكتسبت الكثير من العقاقير الكيميائية المخلقة استخداماً واسع النطاق على مدى سنوات، بما في ذلك هيدرازيد حمض الأيزونيكوتينيك وحمض البارا-أمينوساليسيليك، واللذان استخدما لعلاج السل.

وقد ارتبط اكتشاف آخر في القرن التاسع عشر بالطريقة التي تتفاعل بها الكائنات الدقيقة مع بعضها بعضاً. فقد استخدم الجبن المتعفن، واللحوم والخبز لآلاف السنين في الطب الشعبي لتضميد الجروح. وفي عام ١٨٧٠م، لاحظ كلٌ من تيندال، وباستور، ووليام روبرتس، وهو طبيب بريطاني، التأثير المضاد لكائن حي دقيق على كائن آخر. واقترح باستور، ببصيرته المميزة، أن هذه الظاهرة قد يكون لها بعض الإمكانات العلاجية. وعلى مدى السنوات الخمسين المقبلة، تمت تجربة الكثير من المستحضرات الميكروبية المختلفة كأدوية، ولكنها كانت إما سامة جداً وإما غير نشطة في الحيوانات الحية. وقد أدى هذا إلى اللحظة المحورية في تاريخ الميكروبيولوجي، عندما اكتشف الكسندر فليمنغ البنسيلين في عام ١٩٢٧م (انظر القسم ٢, ١).

في عام ١٨٧٧م، اقترح موريتز تراوبه أن: (أ) تحفز مواد شبه بروتينية التفاعلات التخميرية والتفاعلات الكيميائية الأخرى و(ب) وأنها لا تدمر عند القيام بمثل هذه الأمور. وكانت هذه هي بداية الاعتراف بما نسميه

اليوم الإنزيمات. واقترح أيضًا أن عملية التخمير تتم من خلال تفاعلات متعددة المراحل، والتي يتم فيها نقل الأوكسجين من جزء واحد من جزيء السكر إلى جزءٍ آخر، مما يكون في النهاية بعض المركبات المتأكسدة (مثل ثاني أكسيد الكربون) ومركبات مختزلة (مثل الكحول).

وتم تأسيس مجال الكيمياء الحيوية في عام ١٨٩٧م عندما وجد إدوارد بوخنر أن مستخلصات الخميرة الخالية من الخلايا الكاملة، يمكنها تحويل السكروز إلى الإيثانول. وعليه، تم تعديل وجهات نظر باستور، وأصبح مفهوماً أن عمليات التخمير يمكن أيضاً أن تتم في غياب الخلايا الحية.

وخلال الحرب العالمية الأولى، أسفرت الحاجة إلى الجلسرين المستخدم في صناعة الذخيرة، إلى استخدام الخميرة لتحويل السكريات إلى الجلسرين. وقد أدى هذا التطور بعد الحرب إلى الدراسة المستفيضة من قبل نويبرغ لكيفية عمل هذه التفاعلات المشاركة في تحويل السكريات إلى الإيثانول. تبع هذا دراسات العلماء الهولنديين في دلفت لبحث تفاعلات الأكسدة/ الاختزال وحركية التفاعلات التي يتم تحفيزها بالإنزيمات.



الشكل رقم (١,٣). حاييم وايزمان.

أيضًا أثناء الحرب العالمية الأولى، استخدم حاييم وايزمان (الشكل رقم ١,٣) في جامعة مانشستر بكتيريا حمض البيوتيريك المستخدمة لقرونٍ مضت في تعطين الكتان والقنب، في إنتاج الأسيتون والبيوتانول. وكان استخدامه لبكتيريا الكلوستريديم لإنتاج الأسيتون والبيوتانول هو التطوير الأول لعملية تخمير غير غذائية للإنتاج

على نطاقٍ واسع؛ وخلال ذلك ظهرت مشكلات التلوث الفيروسي والميكروبي، والتي كان لا بد من حلها. وعلى الرغم من أن استخدام عملية التخمير هذه قد تلاشى لعدم قدرتها على منافسة الطرق الكيميائية في إنتاج المذيبات، إلا أنها وفرت قاعدة من الخبرة لتطوير عملية زراعة الفطريات على نطاقٍ واسع لإنتاج حمض الستريك. وبعد وقتٍ قصير من الحرب العالمية الأولى، ابتكرت عملية تخمير هوائية استخدم فيها فطر الأسبرجلس نيجر. ولم تمر سنوات كثيرة، حتى بشرت اكتشافات البنسيلين والستربتوميسين وتطوراتها التجارية ببداية عصر المضادات الحيوية.

(١, ٢) قصة البنسيلين The Penicillin Story

بدأ العصر الذهبي للمضادات الحيوية مع اكتشاف الكسندر فليمينج البنسيلين بالصدفة عام ١٩٢٩م في إنجلترا [٢]. حيث لاحظ أن بعض أطباقه والتي بها الميكروب العنقودي ستافيلوكوكس أوريوس كانت ملوثة بالفطر بنسيليوم نوتاتام، وقد فوجئ برؤية أن أيّاً من المستعمرات البكتيرية لم تتمكن من النمو بالقرب من الفطر. واستنتج أن الفطر كان ينتج نوعاً ما من العوامل المثبطة. ولاحظ أيضاً أن رشيح الفطر حلل الخلايا العنقودية، كما كان غير سام للحيوانات. وأطلق على هذا العامل اسم البنسيلين. وبسبب أن هذا النشاط كان غير مستقر للغاية، وبسبب عدم تمكن فليمينج من الحصول على أي تشجيع من زملائه العلماء بشأن جدوى مثل هذه المواد، فقد تم التخلي عن المشروع.



الشكل رقم (٤, ١). هوارد فلوري.

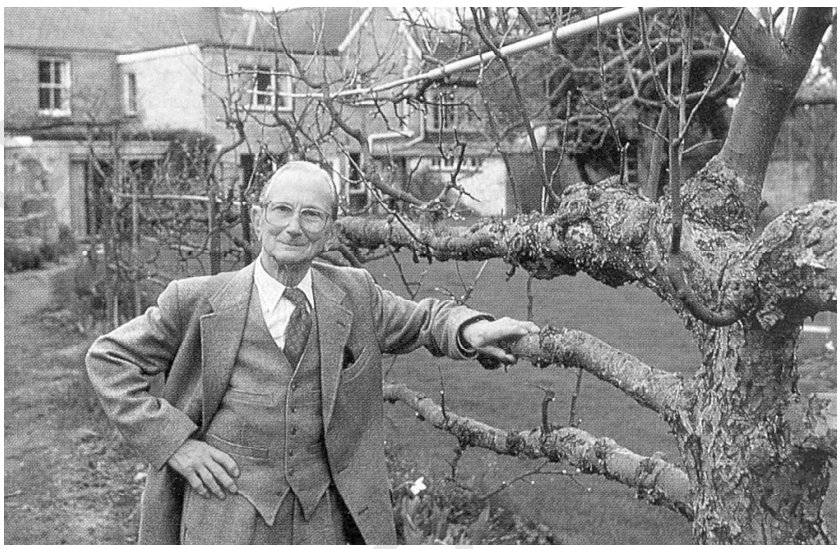


الشكل رقم (٥ , ١) إرنست شاين.

كان لاكتشاف فليمينج للبنسيلين أهمية، بوصفه أول علاج كيميائي ناجح ينتج بواسطة ميكروب، ومن ثمَّ حفز البدء في العصر الذهبي للعقاقير المعجزة. إلاَّ أن الطريق لتطوير البنسيلين كعلاجٍ ناجح لم يكن بالمهمة السهلة. فقد ظل بمثابة الفضول المعملي لعقدٍ من الزمن، وكان هذا الفضول غير مستقر كذلك. وجرت محاولات لعزل البنسيلين في عام ١٩٣٠م من جانب عدد من الكيميائين البريطانين، ولكن عدم استقرار المادة أحبط جهودهم. وعندما بدأت الحرب العالمية الثانية، ومات الكثير من الجنود البريطانيين في ساحة المعركة من الالتهابات البكتيرية بعد إصابتهم بالجروح، بدأت دراسة البنسيلين في عام ١٩٣٩م في مدرسة السير وليام دان لعلم الأمراض في جامعة أكسفورد بواسطة هوارد فلوري (الشكل رقم ٤ , ١)، وإرنست شاين (الشكل رقم ٥ , ١)، ونورمان هيتلي (الشكل رقم ٦ , ١)، وإدوارد أبراهام، وزملائهم. وأدى هذا الجهد إلى النجاح في إعداد مستحضر لنموذج مستقر للبنسيلين، والتدليل على نشاطه المضاد للبكتيريا اللافت للنظر وعدم سميته في الفئران.

وللأسف، كان إنتاج البنسيلين من سلالة بنسيليوم نوتاتام بطيئاً جداً بحيث إنه استغرق أكثر من سنة لجمع ما يكفي من المادة لإجراء التجارب السريرية على البشر [٣]. وعندما نجحت الاختبارات السريرية، أصبح الإنتاج على نطاقٍ كبير شيئاً أساسياً، مما دفع فلوري وزملاؤه للذهاب إلى الولايات المتحدة في صيف عام ١٩٤١م لطلب المساعدة. وهناك أقنعوا مختبر البحوث الشمالية الإقليمية (NRRL) في وزارة الزراعة الأمريكية (USDA) في

بيوريا، إلينوي، والكثير من شركات الأدوية الأمريكية (بما في ذلك شركة ميرك، وسكويب، وفايزر) لتطوير الإنتاج التجاري للبنسيلين. وظل هيتلي لفترة في الـ NRRL للعمل مع موير وكوجيل [٤]. وهكذا بدأ جهد تعاوني بين الجامعة والمختبرات الصناعية في الولايات المتحدة، والمؤسسات الأكاديمية في المملكة المتحدة، والتي استمرت طوال الحرب.



الشكل رقم (٦, ١). نورمان هيتلي.

وكانت النتيجة إنقاذ آلاف الأرواح، داخل وخارج ميدان المعركة. وكان اكتشاف وتطوير المضادات الحيوية من مجموعة البيتا لاكتام بين أقوى الإنجازات للعلم الحديث والتقنية. وتبع اكتشاف فليمينج للفطر المنتج للبنسيلين بالصدفة سنوات من التقدم المطرد، واليوم تعد مجموعة مركبات البيتا لاكتام واحدة من أكثر الأمثلة الناجحة لتطبيقات المنتجات الطبيعية والعلاج الكيميائي.

وفي أربعينيات القرن الماضي بدأت فترة من التطوير المكثف في علم الوراثة الميكروبية [٥]. فعلى الرغم من أن السلالة الأصلية لفليمينج أنتجت كميات ضئيلة من البنسيلين، فقد صنعت "القوة الغاشمة" للتلاعب الجيني قفزات هائلة في القدرة الإنتاجية، وأدت إلى تقنية جديدة تعرف باسم "تحسين السلالة". وركزت هذه الدراسات الوراثية الأولية إلى حدٍ كبير على إنتاج الكائنات المطفرة أو المعدلة وراثياً، ودراسة خواصها. وقد اجتذبت السهولة التي يمكن بها التغيير "الدائم" لخصائص الكائنات الحية الدقيقة عن طريق التطفير، وكذلك بساطة أسلوب التطفير علماء الميكروبيولوجي بدرجة كبيرة. وتأسس برنامج تعاوني لاختيار السلالة بين العاملين في وزارة الزراعة الأميركية في بيوريا، ومؤسسة كارنيجي، وجامعة ستانفورد، وجامعة ويسكنسن.

بدأ اختيار السلالة بالبنسليوم كريزوجينوم NRRL1951، السلالة المعروفة والمعزولة من شمام متعفن من سوق بيوريا. وكانت هذه السلالة قادرة على إنتاج ٦٠ ميكروجرام/ مل. وأدت زراعة الطفرات التلقائية وزراعة الجرثومة الواحدة إلى سلالات أكثر إنتاجية من NRRL1951. واحدة منها NRRL1951-1325 أنتجت ١٥٠ ميكروجرام/ مل. وتم تعريضها بعد ذلك لأشعة إكس بواسطة ديميريك في معهد كارنيجي في كولد سبرنج هاربور، نيويورك، وتم الحصول على الطفرة. X-1612 وهذه أنتجت ٣٠٠ ميكروجرام/ مل. وحصل العاملون في جامعة ويسكونسن على سلالات ديميريك الناتجة بالتطفير بأشعة إكس. وأصبح واحد منها، Q-176، والذي أنتج ٥٥٠ ميكروجرام/ لتر، الأصل لجميع السلالات المستخدمة في الصناعة. وأصبحت "عائلة ويسكونسن" من السلالات المتفوقة معروفة جيداً في جميع أنحاء العالم، وبعضها ينتج أكثر من ١٨٠٠ ميكروجرام/ مل. وأصبح الجهد لتطوير البنسيلين هو بداية لانخراطٍ طويلٍ بين علم الوراثة وعلم الميكروبيولوجيا الصناعية، والتي أثبتت في النهاية أن الطفرة كانت العامل الرئيس المتسبب في الزيادة التي تقدر بمائة إلى ألف ضعف في إنتاجية منتجات الأيض الميكروبي.

وتم إنتاج البنسيلين بصفةٍ أساسية في المزارع النامية بالطريقة السطحية، ولكن وجد أن معدلات الإنتاج كانت منخفضة جداً. وسرعان ما أصبحت الزراعة بالطريقة المغمورة هي الأسلوب المفضل. وتمت زيادة الإنتاجية بمائة ضعف في غضون بضع سنوات عن طريق استخدام تحسين السلالة وتحويرات البيئة الغذائية مثل استخدام شراب منقوع الذرة كمادة مضافة. وقد تحقق قدر كبير من الفهم لفيسيولوجية فطر البنسيليوم كريزوجينوم فيما يتعلق بإنتاج البنسيلين بواسطة البروفيسور مارفن جونسون (الشكل رقم ١,٧) وطلابه في جامعة ويسكونسن. وقد ظهرت أيضاً نجاحات علاجية أخرى في كلٍ من المملكة المتحدة والولايات المتحدة، وأخيراً، في عام ١٩٤٣م، تم استخدام البنسيلين لعلاج الجرحى في المعركة.

وفي الخمسينيات، تم إدراك أن فطر البنسيليوم كريزوجينوم يمكن أن يستخدم مركبات أسيل إضافية كمرادفات جانبية السلسلة (عدا حمض الفينيل أسيتيك لإنتاج البنسيلين ج) وتنتج بنسيلينات جديدة، وحقق واحد من هذه، البنسيلين في (فينوكسي ميثيل بنسيلين)، نجاحاً تجارياً. ونتج تطبيقه التجاري من ثباته في الأحماض مما سمح بتناوله عن طريق الفم، وهذه كانت ميزة كبيرة له على البنسيلين ج (بنزيل بنسيلين). وأصبح البنسيلين ج وفي أهم البنسيلينات التجارية. وفي الإنتاج التجاري، كانت البيئة الغذائية المعتادة معقدة، وتتكون من الجلوكوز، وشراب منقوع الذرة، والمرادفات جانبية السلسلة (حمض الفينيل أسيتيك للبنسيلين ج، أو حمض الفينوكسي أسيتيك للبنسيلين في)، والأملاح المعدنية. وكان الاكتشاف الأول بأن الجلوكوز كان له أثرٌ سلبيٌ على تكوين البنسيلين عن طريق جونسون وطلابه [٦، ٧]. حيث وجدوا أن الجلوكوز كان ممتازاً للنمو ولكنه غير جيد لتكوين

البنسيلين، بينما أظهر سكر اللاكتوز النمط المعاكس، واقترحوا بيئة غذائية تحتوي كلاً منهما، حيث يحدث النمو باستخدام الجلوكوز، وعندما يتم استهلاك الجلوكوز فإن كتلة الخلايا تبدأ في إنتاج المضاد الحيوي باستخدام اللاكتوز. وخلافاً للجلوكوز، فإن اللاكتوز يستهلك ببطء، ولا يظهر كبح الكربون الهدمي في العملية. وبعد ذلك، وجد ديفي وجونسون [٨] أن التغذية المتقطعة أو المستمرة للجلوكوز الأقل تكلفة يمكن أن تحل محل تغذية اللاكتوز على دفعات. وقد مثل هذا ولادة مفهوم التخمير دفعي التغذية، والذي يعد شائعاً في صناعة التخمير اليوم.



الشكل رقم (١,٧). مارفن جونسون.

وقد تمت دراسة التخليق الحيوي للبنسيلين من مرادفاته (السيستين، الفالين، حمض الفينيل أسيتيك) بنشاط خلال الخمسينيات والستينيات والسبعينيات. وكانت العلاقة بين الليسين وتكوين البنسيلين ذات أهمية كبيرة. ففي عام ١٩٤٧م، لاحظ ديفيد بونر أن ٢٥٪ من السلالات الأوكسوتروف بالنسبة لليسين التي أنتجها من فطر البنسيليوم كريزوجينوم، فشلت في إنتاج البنسيلين، وتوقع أن (أ) هناك علاقة ما بين المضاد الحيوي والحمض الأميني، و(ب) يوجد مرادف مشترك بين المركبين. وبعد عشر سنوات ثبت أنه كان على صواب تماماً، عندما وجد دومان [٩] أن الليسين مثبط قوي لإنتاج البنسيلين. وقادت حقيقة أن التثبيط يمكن عكسه باستخدام حمض ألفا-أمينوأديبيك إلى الفرضيات [١٠] أن (أ) حمض ألفا أمينوأديبيك كان ضالعاً في تكوين البنسيلين على الرغم من أنه

لا يدخل في جزيء البنسيلين النهائي، (ب) أن البنسيلين يشتق من ألفا-كيتوجلوتارات وأسيتيل-العامل المساعد (أ) بواسطة المسار التخليقي لليسين في الفطر، و(ج) أن تثبيط الليسين لإنتاج البنسيلين يرجع إلى التثبيط الرجعي لليسين لتكوينه نفسه، مما يحد من تكوين حمض ألفا-أمينوأديبيك. وبصورةٍ مستقلة، اكتشف آرنشتاين وزملاؤه [١١] ثلاثي الببتيد-جاما-ألفا-أمينوأديبيل-سيستينيل فالين كمركب داخل الخلايا في فطر البنسيليوم كريزوجينوم. وأثبتت النتائج في مختبرات عديدة أهمية حمض الفا-أمينوأديبيك كمرادف لجميع أنواع البنسيلين. وسرعان ما أثبت أن جاما-ألفا-أمينوأديبيل-سيستينيل فالين هو وسيط مصيري لتكوين البنسيلين. وقد ثبت في وقت لاحق أن حساسية التفاعل للتثبيط الرجعي بالليسين هي الخطوة الأولى لتكوين الليسين في الفطريات، وهو ما عرف بتفاعل الهوموسيترات سينسيز [١٢، ١٣].

خلال الخمسينيات، أصبح مستقبل البنسيلين مشكوكاً فيه بسبب ظهور سلالات مقاومة من البكتيريا العنقودية ستافيلوكوكس أوريوس في المستشفيات. وكونت سلالة الستافيلوكوكس مقاومة البنسيلين عن طريق اختيار السلالات المنتجة لإنزيم البنسيلينيز المحلل للبنسيلين، ولذلك كانت هناك حاجة واضحة لدواء جديد لمكافحة هذه السلالات المقاومة. وكانت البنسيلينات المستخدمة حتى هذه اللحظة قابلة للذوبان في المذيبات، وأظهرت درجة عالية من النشاط ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام، ولكن كانت أقل نشاطاً بكثيرٍ ضد البكتيريا السالبة لصبغة جرام. ولحسن الحظ، حدث تطوران أديا إلى إعادة الاهتمام بالبنسيلين والمضادات الحيوية ذات الصلة. كان الأول عام ١٩٥٩م في اليابان بواسطة كويشي كاتو، وهو اكتشاف تراكم "نواة البنسيلين" في محاليل مزارع فطر البنسيليوم كريزوجينوم، والتي لم يضاف إليها أي مرادفات جانبية السلسلة [١٤]. وعزل باتشيلور وآخرون في المملكة المتحدة [١٥] مركب حمض ٦-أمينو بنسيلانيك (6-APA) والذي كان "نواة البنسيلين" التي اكتشفها كاتو. واستعمل 6-APA لإنتاج البنسيلينات "شبه المخلقة" (تحورات كيميائية للمضاد الحيوي الطبيعي)، مع الخصائص المفيدة لمقاومة إنزيم البنسيلينيز والحامض، بالإضافة إلى النشاط واسع المدى المضاد للبكتيريا.

وكان التطور الثاني هو اكتشاف نوع مختلف تماماً من البنسيلين، وهو نوع يذوب في الماء، والذي أظهر نشاطاً مماثلاً ضد كلٍ من نوعي الكائنات الدقيقة (البنسيلين ن). وتم اكتشاف هذا المركب بشكلٍ مستقل من قبل مجموعتين من العلماء. ففي عام ١٩٤٨م نشر بروتزو أعماله [١٦] في مجلة علمية غير معروفة في سردينيا عن عزل سلالة منتجة لمضاد حيوي من فطر سيفالوسبوريم أكريمونيوم (أعيد تصنيفها فيما بعد كأكريمونيوم كريزوجينوم) من مياه الصرف الصحي. ولعدم قدرته على تنقية المضاد الحيوي، فقد بعث السلالة إلى فلوري في أكسفورد حيث كان فطر البنسيليوم نوتاتام منذ نحو عشر سنوات سابقاً في مرحلةٍ مماثلة في التاريخ. بينما كان العلماء البريطانيون يدرسون مكونات مركب هذا المضاد الحيوي، أعلن الباحثون في وزارة الصحة بميتشيجان في الولايات المتحدة

[١٧] أن سلالة من تيلاكليديم أنتجت مضاداً حيوي جديد أطلقوا عليها اسم "سينيماتين". وبعد إعادة تصنيف السلالة كسيفالوسبوريم سالموسينينيماتم [١٨]، تبين أن السينيماتين كان مركباً من جزيئين، أ وب. ولم ينشر شيء على الإطلاق تقريباً على الجزيء أ، وليس لدينا اليوم معرفة عن علاقته التركيبية بالجزيء ب. وعندما كان هذا العمل يجري في ميتشيجان، أعلن البريطانيون [١٩، ٢٠] أن سلالة بروتزو أنتجت مضادين حيويين، وهما "السيفالوسبورين بي"، والنشط فقط ضد الكائنات الموجبة لصبغة جرام، و"السيفالوسبورين إن"، والذي كان نشطاً ضد كلٍ من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام. ووجد أن "السيفالوسبورين بي" له طبيعة ستيرويدية وليس بيتا-لاكتام على الإطلاق. ومن ناحيةٍ أخرى، وجد أبراهام وزملاؤه (الشكل رقم ١,٨) [٢١] أن "السيفالوسبورين إن" هو بنسيلين حقيقي يحتوي على سلسلة جانبية من ألفا-د-أمينوأديبيل، وكان مماثلاً تماماً للسينيماتين ب [٢٢]. وتمت إعادة تسميته ليكون "البنسيلين ن" وكان بالمقارنة مع البنسيلين ج نشطاً فقط بمقدار ١٪ فقط ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام، ولكن كان له نشاطٌ مساويٌ أو أكبر قليلاً للنشاط ضد البكتيريا السالبة لصبغة جرام. وترجع طبيعة الذوبان في الماء للبنسيلين "ن" ونشاطه المتساوي تقريباً ضد البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام إلى وجود مجموعة الكربوكسيل في السلسلة الجانبية.



الشكل رقم (١,٨). جاي نيوتن وإدوارد إبراهام.

ولم يؤد النجاح الهائل الذي تحقق في المعركة ضد المرض باستخدام البنسيلين ج فقط إلى منح جائزة نوبل لفليمينج، وفلوري، وشاين، ولكن أيضاً لحقلٍ جديد في أبحاث المضادات الحيوية، وصناعة جديدة للمضادات

الحيوية. ومهد البنسيلين الطريق لتطوير مضادات حيوية أخرى كثيرة، ولا يزال الأكثر نشاطاً وواحد من أقل هذه المركبات سمية. واليوم، يستخدم حوالي ١٠٠ مضاد حيوي لمكافحة العدوى في البشر والحيوانات والنباتات.

(١,٣) قدوم السيفالوسبورين The Coming of the Cephalosporins

يعدُّ إنتاج سلالة بروتزو من سلالة أ. كريزوجينزم لمضاد حيوي ثاني، والذي تم في معمل إدوارد إبراهام في جامعة أكسفورد، تطوراً مهماً. فبعد إسهاماته المهمة كجزء من فريق فلوري للبنسيلين، أسس إبراهام مختبراً مستقلاً في جامعة أكسفورد. ووجد إبراهام ونيوتن [٢٣] أن المركب الجديد يرتبط بالبنسيلين ن في أنه يتكون من حلقة بيتا-لاكتام مرتبطة بسلسلة جانبية والتي كانت مطابقة للبنسيلين ن، وهذا هو حمض د-ألفا-أمينوأديبيك. ويختلف عن البنسيلينات، مع ذلك، في احتوائه على حلقة سداسية من داي هيدروسيازين بدلاً من حلقة السيازوليدين الخماسية للبنسيلينات. وأطلق عليه السيفالوسبورين سي. وهكذا، بدأت حقبة السيفالوسبورين.

وسميت نواة السيفالوسبورين سي بحمض ٧-أمينو سيفالوسبورانيك (7-ACA). ويمتص السيفالوسبورين سي الأشعة فوق البنفسجية بقوة، وكان لا يتأثر بالأحماض ولا بإنزيم البنسيلين-بيتا-لاكتاميز، وغير سام، وله نشاط داخل جسم الفئران الحية. وكانت كيفية تأثيره مثل البنسيلين، أي، تثبيط تكوين جدار الخلية البكتيرية. وعلى الرغم من أن كلاً من البنسيلين ن والسيفالوسبورين سي لم ينتجا على نطاقٍ تجاري، فقد أديا إلى معرفة مهمة عن تخليق هذه المركبات وتطوير الكثير من السيفالوسبورينات شبه المخلقة الاصطناعية ذات الفائدة الكبيرة في مجال الطب.

وكانت خاصية عدم تأثير السيفالوسبورين سي بالأحماض جذابة للغاية. وكان العيب الرئيس للجزيء نشاطه الضعيف، كان له فقط ٠,١٪ من نشاط البنسيلين ج ضد البكتيريا العنقودية الحساسة، على الرغم من أن نشاطه ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام كان مساوياً لنشاط البنسيلين ج. ومع ذلك، تم الحصول على مركب شبه مخلق مقاوم لإنزيم البنسيلينيز، والذي كان ١٠٠ مرة أكثر نشاطاً من السيفالوسبورين سي، عن طريق إزالة السلسلة الجانبية من حمض دي-ألفا-أمينوأديبيك واستبدالها بحمض فينيل أسيتيك. وتم الحصول على سيفالوسبورينات أخرى جديدة ذات مدى واسع مضاد للبكتيريا واسع في السنوات التي تلت ذلك، على سبيل المثال، سيفالوتين، وسيفالوريدين وسيفالوغليسين، مما جعل السيفالوسبورينات شبه المخلقة أهم مجموعة من المضادات الحيوية في ذلك الوقت. وكانت مقاومة السيفالوسبورينات لإنزيم البنسيلينيز؛ بسبب حلقة الداي هيدروسيازين حيث (١) أن السلسلة الجانبية لحمض دي-ألفا-أمينوأديبيك لم تمنع مهاجمة البنسيلين ن و(٢) إن إزالة مجموعة الأسيتوكسي من سيفالوسبورين سي لم تقلل من مقاومته لإنزيم البنسيلينيز. وقد منع سيفالوسبورين سي تأثير إنزيم البنسيلينيز على البنسيلين ج في البكتيريا باسيلس سيريوس بصورة تنافسية. وعلى الرغم من أنه لم

يكن له تأثير مماثل على إنزيم بكتيريا ستافيلوكوككس أوريوس، إلا أن بعض مشتقاته أثرت. وكانت الميزة الأخرى في إمكانية إعطاء السيفالوسبورينات لبعض المرضى الذين كان عندهم حساسية للبنسيلين.

من الناحية التخليقية، كانت العلاقة بين البنسيلين ن والسيفالوسبورين سي ذات أهمية كبرى. وكان العمل على المستوى تحت الخلوي، والذي قام به إبراهام وزملاؤه من أكسفورد في السبعينيات، [٢٤] تطوراً مهماً والذي أدى إلى تقدمٍ سريع في هذا المجال. حيث استخدموا المحتوى البروتوبلازمي لخلايا أكريمونيوم كريزوجينوم بعد تحليلها لتحويل الحمض الأميني الفالين المعلم بالنظائر المشعة إلى البنسيلين. وأدى هذا إلى اكتشاف تفاعل تمدد الحلقة في معهد ماساتشوستس للتكنولوجيا في عام ١٩٧٦م [٢٥]، والذي تم تحفيزه بإنزيم "الإكسباندين" (دي أسيتوكسي سيفالوسبورين سي سينسيز، DAOCS). وقد أعتقد لسنواتٍ عديدة أن البنسيلين ن والسيفالوسبورين سي كانا منتجين مختلفين لأفرع تخليقية مختلفة في أكريمونيوم كريزوجينوم. ومع ذلك، أظهر اكتشاف تفاعل تمدد الحلقة أن السيفالوسبورينات تنتج من البنسيلين. وأكد يوشيدا وآخرون هذا في عام ١٩٧٨م [٢٦]، حيث أثبتوا أن إنزيم تمدد الحلقة حول البنسيلين ن إلى دي أسيتوكسي سيفالوسبورين سي. وفشلت مستخلصات الطفرات التي أنتجت تخميرياً فقط البنسيلين ن وليس السيفالوسبورينات في أن تؤدي هذا التفاعل، في حين قامت الطفرات التي أعترضت مبكراً (سالبة بالنسبة لإنتاج كلٍ من البنسيلين ن والسيفالوسبورينات) بتوسيع الحلقة بالفعل.

ومن السبعينيات إلى الثمانينيات، تراكمت المعرفة المتعلقة بتخمير وإنتاج السيفالوسبورين سي. وعلى قدرٍ كبيرٍ من الأهمية كان (١) التحفيز بواسطة دي-إل-ميثيونين عبر آلية تنظيمية لا علاقة لها بقدرتها على المساهمة بذرة الكبريت في المضاد الحيوي [٢٧]، (٢) استخدام الخلات كمرادفات لمجموعة الأسيتوكسي [٢٨]، (٣) إل-سيستين وإل-فالين [٢٩] كمرادفات لنواة المركب، و(٤) حمض ألفا-إل-أمينوأديبيك كمرادفات للسلسلة الجانبية دي-ألفا-أمينوأديبيل في سيفالوسبورين سي [٣٠]. ووفر بانكو وآخرون [٣١] خطوة مهمة إلى الأمام عندما أوضحوا أن نشاط الإنزيم من خلايا أكريمونيوم كريزوجينوم كون المرادف ثلاثي الببتيد المهم لكل البنسيلينات والسيفالوسبورينات، وهو جاما-إل-ألفا-أمينوأديبيل-إل-سيستينيل-دي-فالين (LLD-ACV). وقد ثبت أن الإنزيم المخلق لـ ACV هو إنزيم وحيد متعدد الوظائف يعمل على حمض إل-ألفا-أمينوأديبيك، وإل-سيستين وإل-فالين لينتج LLD-ACV. وكان أيضاً عزل هولاندر وآخرون [٣٢] للإنزيم النقي المخلق للأيزوبنسيلين ن ("سيكليز")، والذي يحول LLD-ACV إلى أيزوبنسيلين ن مهماً.

وانهارت فكرة أن البيتا-لاكتامات تنتج فقط بواسطة الفطريات بعد تقرير من شركة ميرك أن أحد الإستربتوميسيتات أنتج البنسيلين ن [٣٣]. وقدمت هذه النتيجة المثيرة في الاجتماع السنوي للجمعية الاميركية للميكروبيولوجي عام ١٩٦٢م، ونشرت فقط كملصق علمي. وعلى الرغم من أن كثيراً من الشك ألقي بظلاله على

هذا التقرير، نشرت شركة ايلي ليلي، وشركة ميرك تقريرين نحو ٩ إلى ١٠ سنوات لاحقاً [٣٤، ٣٥] أفادا أن الأنواع المختلفة من الإستربتوميسيتات والنوكارديا أنتجت السيفالوسبورينات المعدلة عند ذرة الكربون رقم ٧ (السيفاميسين)، وكذلك مع/ أو على السلسلة الجانبية المرتبطة بذرة الكربون رقم ٣. وأدى اكتشاف السيفاميسين سي إلى الكثير من البحث والتطوير في مجال السيفالوسبورينات المنتجة من الكائنات بدائية النواة، حيث جعل وجود مجموعة الميثوكسي على حلقة البيتا-لاكتام المركب أكثر نشاطاً ضد البكتيريا الممرضة السالبة لصبغة جرام واللا هوائية وأكثر مقاومة لإنزيمات البيتا-لاكتاميز من الكائنات السالبة لصبغة جرام. وأتيحت مركبات للمرة الأولى في تاريخ البتا-لاكتامات، والتي أظهرت درجة عالية من الثبات تجاه هذه الإنزيمات المزعجة نوعاً ما. ومثل السيفالوسبورينات سي الفطرية، لم يستخدم السيفاميسين سي أبداً سريرياً، ولكن استخدم للتركيب شبه التخليقي للعديد من المركبات المفيدة طبياً. وتم تسويق السيفامسين آخر شبه تخليقي أكثر قوة، السيفوكسيتين، بصورة أسرع بواسطة شركة ميرك، والذي أتبعه في وقتٍ لاحق السيفميتازول، والتيموسيلين، والسيفوتيتان والسيفالوسبورينات شبه التخليقية الأخرى.

ومن السبعينيات إلى الثمانينيات، تطورت المسارات إلى البنسيلينات والسيفالوسبورينات، بما فيها السيفاميسين سي، وخاصةً بعد إتاحة الأنظمة الخالية من الخلايا [٢٤، ٣٦]. وفي أواخر السبعينيات، ظهرت تقارير عن إنتاج المضادات الحيوية البيتا-لاكتام، والتي لم تكن بنسيلينات ولا سيفالوسبورينات. وكان الأهم هو حمض الكلافيولانيك من الإستربتوميسيتات، والذي امتلك نشاطاً ضعيفاً كمضاد حيوي، ولكنه كان مثبطاً ممتازاً للبيتا-لاكتاميز (انظر القسم ١,٨,١). وأصبح مركباً مطلوباً لكونه يوصف مجتمعاً مع البنسيلينات شبه التخليقية واسعة المدى، والتي تتأثر بالبيتا-لاكتاميز، على سبيل المثال، مع الأموكسيسيلين، وعرفت هذه التركيبة بالأوجمنتين.

وكان اكتشاف شركة ميرك للكاربابينيمات تطوراً آخر مهماً في تاريخ المضادات الحيوية البيتا-لاكتام. تم اكتشاف الأول، الثينامايسين، بواسطة كاهان وآخرون [٣٧] باستخدام نظام فحص على أساس تثبيط تخليق الببتيدوجليكان. وتم إنتاج المضاد الحيوي من الإستربتوميسس كاتليا، والذى ينتج أيضاً السيفاميسين سي. وتشبه الكاربابينيمات البنسيلينات في وجود حلقة بيتا-لاكتام متحدة بحلقة خماسية. وتختلف في أن الحلقة الخماسية كانت غير مشبعة وتحتوي على ذرة كربون بدلاً من الكبريت. وكان الكبريت، على الرغم من ذلك، موجوداً في موقع آخر في جميع الكاربابينيمات المنتجة بواسطة الإستربتوميسيتات. وذكر عدد كبير من الكاربابينيمات، ولكن كان الثينامايسين الأكثر أهمية. وفي الواقع، كان المركب المضاد للبكتيريا الأكثر قوة، والأوسع طيفاً، وغير السام الذي وجد على الإطلاق. وهو يثبط تركيب الجدار الخلوي، كما تفعل البنسيلينات والسيفالوسبورينات، وكان مقاوماً نسبياً لإنزيمات للبيتا-لاكتاميز الميكروبية.

ومهد تطوير تقنية العملية التجارية لنواة البنسيلين (6-APA) ونواة السيفالوسبورين (7-ACA) الطريق للأسيلة الكيميائية بالكثير من السلاسل الجانبية، منتجاً الكثير من البنسيلينات والسيفالوسبورينات شبه التخليقية المطورة ذات مدى أوسع ضد البكتيريا وخواص دوائية أفضل. وأصبحت البنسيلينات والسيفالوسبورينات واسعة المدى أفضل المضادات البكتيرية مبيعاً في الساحة الدوائية.

(١,٤) حقبة واكسمان The Waksman Era

زامن مجيء البنسيلين، والذي ألمح إلى بداية عصر المضادات الحيوية، في الأربعينيات اكتشافات سيلمان واكسمان (الشكل رقم ١,٩)، وهو خبير في ميكروبيولوجي الأراضي في جامعة روتجرز. ونجح وطلابه، وخصوصاً بويد وودروف، وألبرت شاتس، وهوبير ليشيفاليير، في اكتشاف الكثير من المضادات الحيوية الجديدة من البكتيريا الخيطية، الأكتينوميسيتات، مثل الأكتينوميسين دي، النيوميسين، والأكثر شهرة منها "الدواء المعجزة" الستربتوميسين. وحدثت هذه الاكتشافات لقدرة الأكتينوميسيتات على إنتاج المضادات الحيوية قبل التطورات المذكورة قبلاً عن إنتاج البكتيريا الخيطية للبيتا-لاكتامات. ونشر واكسمان و وودروف عام ١٩٤٠م عن اكتشافات الأكتينوميسينات، والتي كانت كروموأوليجوببتيدات [٣٨]. وتم استخدام مركب واحد من هذا القبيل، الأكتينوميسين دي، لسنواتٍ لمكافحة ورم ويلمس في الأطفال، وأصبح أداة مهمة جداً في تطوير البيولوجيا الجزيئية كمثبط لإنزيم بلمرة الحمض النووي الريبوزي.



الشكل رقم (١,٩). سيلمان واكسمان و بويد وودروف.

تم استخدم الستربتوميسين، بعد اكتشافه التاريخي في عام ١٩٤٤م من قبل واكسمان، وشاتس، وبوجي [٣٩] بوصفه منتجاً من الإستربتوميسس جريسيوس، ضد السل الناتج من ميكوباكتريم توبركلوزيس وأيضاً ضد البكتيريا السالبة لصبغة جرام؛ وعولج أيضاً التهاب السحايا البكتيري بالإستربتوميسين. واعترف بتأثيره الكبير على الطب بمنح جائزة نوبل لواكسمان عام ١٩٥٢م. ومهد هذا الأمينوجليكوزيد، كأول مضاد حيوي تجاري ناجح ينتج من أكتينوميسيت، الطريق إلى الاعتراف بهذه الكائنات كأكثر منتجي المضادات الحيوية وفرة. وقدم الستربتوميسين أيضاً أداة قيمة لدراسة وظيفة الخلية. وبعد فترة من الوقت، والذي كان يظن خلالها أنه يعمل عن طريق تغيير النفاذية، تم الاعتراف بأن تداخله في تخليق البروتين هو تأثيره الأساسي. وقدم تفاعله مع الريبوسومات الكثير من المعلومات عن بنيتها ووظيفتها، فهو لم يثبط عملها فقط ولكنه سبب أيضاً القراءة الخاطئة للشفرة الوراثية، وكان مطلوباً لوظيفة الريبوسومات في السلالات المطفرة المعتمدة على الستربتوميسين.

ونشر واكسمان مع ليشيفالليير عن اكتشاف النيوميسين في عام ١٩٤٨م [٤٠]، والكانديسيدين في عام ١٩٥٣م [٤١]. واستخدم النيوميسين، وهو أمينوجليكوزيد ينتج بواسطة إستربتوميسس فريدي، بوصفه مضاداً حيوياً موضعياً للبكتيريا، والكانديسيدين عديد الروابط الثنائية، المنتج بواسطة إستربتوميسس غريسيوس، كمضاد حيوي موضعي للفطريات.

وأدى التعاون في تطوير العمليات الصناعية بين جامعة روتجرز، وجامعة برنستون، وجامعة كولومبيا، وشركة ميرك إلى ولادة مجال الهندسة الحيوية. وتمكن واكسمان، عن طريق حقوق ملكية الستربتوميسين المدفوعة إلى جامعة روتجرز من قبل شركة ميرك المصنعة، من بناء المعهد العالمي الشهير للميكروبيولوجي.

وأثرت اكتشافات الأمينوجليكوزيدات في روتجرز في عصر المضادات الحيوية، وأسفرت عن اكتشاف الكثير من "العقاقير المعجزة" مثل الكلورامفينيكول في عام ١٩٤٧م [٤٢]، والتتراسيكلينات في عام ١٩٤٨م [٤٣]، والماكروليدات مثل الاريثروميسين في عام ١٩٥٢م [٤٤]، والجليكوببتيدات مثل الفانكوميسين في عام ١٩٥٦م [٤٥]، والأمينوجليكوزيدات الإضافية مثل الجنتاميسين في عام ١٩٦٣م [٤٦]، البيتا-لاكتامات مثل السيفاميسينات في عام ١٩٧٠م [٣٤ ، ٣٥]، والكاربابينيمات في عام ١٩٧٩م [٣٧]، الأنزاميسينات مثل الريفاميسن في عام ١٩٥٧م [٤٧]، والماكروليدات عديد الروابط الثنائية مثل النيستاتين في عام ١٩٥٠م [٤٨]. وقد تم اكتشاف حوالي ١٥٠٠٠ منتجٍ للأيض الثانوي الميكروبية، ومنها حوالي ١٢٠٠٠ من المضادات الحيوية. وشمل تركيبها الكيميائي غير العادي حلقات البتا-لاكتام، والببتيدات الحلقية المحتوية على أحماض أمينية "غير طبيعية" وغير بروتينية، وسكريات ونيكليوزيدات غير عادية، وعديدة الروابط الثنائية، والماكرولايدات كبيرة الحلقات. وعلى الرغم من أن معظمها كان عديم الفائدة بالنسبة للبشر، كونها إما سامة جداً وإما غير نشط في

الكائنات الأرقى، فقد أنقذ غيرها الحياة. كانت المضادات الحيوية عملياً العقاقير الوحيدة المستخدمة في العلاج الكيميائي ضد الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض وكانت حاسمة في زيادة متوسط العمر المتوقع في الولايات المتحدة من ٤٧ سنة في عام ١٩٠٠م إلى ٧٤ سنة للرجال و٨٠ سنة للنساء في عام ٢٠٠٠م.

ولسببٍ ما، كانت الأكتينوميسيتات مثمرة بصورةٍ مذهلة في عدد المضادات الحيوية التي يمكن أن تنتجها. وتم الحصول تقريباً على حوالي ٧٠٪ من جميع المضادات الحيوية من هذه الكائنات الخيطية بدائية النواة، و٧٥٪ من هذه بدورها أنتجت من جنس واحدة، الإستربتوميسيس. ومن المدهش جداً أن سلالات من الإستربتوميسيس هيجروسكوبيكوس أنتجت أكثر من ١٨٠ من منتجات الأيض الثانوي المختلفة. وتنتج البكتيريا وحيدة الخلية نحو ١٠٪ من المضادات الحيوية، وتنتج الفطريات حوالي ٢٠٪ [٤٩]. وتم اكتشاف منتجات بيولوجية نشطة جديدة من الميكروبات بوتيرة مذهلة: من ٢٠٠-٣٠٠ في العام في أواخر السبعينيات، وزادت إلى ٥٠٠ سنوياً في التسعينيات. وصاحبت المضادات الميكروبية المخلقة مثل الكينولونات والفلوروكينولونات المضادات الحيوية المنتجة طبيعياً في الساحة الدوائية. وحتى هذه المواد التخليقية يرجع اكتشافها إلى منتج طبيعي، وهو الكينين. وقد تم نمذجة الكينولون الأول، حمض النااليديكسيك، على غرار الكينين. ومع ذلك، تباطأ الاستخدام التجاري للمضادات الحيوية في الثمانينيات، وتم التسويق التجاري لثلاثة فقط، الدابتوميسين، خلات الكاسبوفنجين، والأوكسازوليدينون المخلق، في العقود التي تلت ذلك.

(١,٥) تحسين السلالة Strain Improvement

لقد أدت الخبرات المذكورة سابقاً، والتي تم فيها تطفير وفرز السلالات المنتجة للبنسيلين لتحسين الإنتاج، إلى الاستخدام الواسع النطاق لعلم الوراثة لتحسين قدرة الإنتاج [٥٠]. فمنذ بداية الخمسينيات، استعيض عن المعالجة الجينية مثل التطفير/ الفرز بالتطفير/ الاختيار/ الفرز، والتي استخدمت فيها طرق إنتقاء مختلفة لتقليل عدد السلالات التي يجب فرزها لتحسين الإنتاج. ووجد بعد ذلك أن مشتقات جديدة، وبعضها أفضل من الجزيء الأم أو الأصلي، يمكن إنتاجها بواسطة السلالات المطفرة. وكان أول من اكتشف هذا كيلنر في عام ١٩٤٩م [٥١]، ولكن لم يتم عزل وتعريف المشتقات الأكثر نشاطاً. ومع ذلك، فقد اكتشفت نواتج الأيض دي ميثيل تيتراسيكلين [٥٢] والدوكسوروبيسين [٥٣] المفيدة طبياً لاحقاً عن طريق تطفير السلالات المنتجة للتراسيكلين والداونوميسين، على التوالي. وفي عام ١٩٦٩م، تم ابتكار تقنية "التخليق التطفيري الحيوي" بواسطة أساتذة جامعة إلينوي كينيث رينيهارت وديفيد غوتليب والطالب و.ت. شير [٥٤]. في هذه العملية، تم تغذية سلالة مطفرة بعد اعتراض الأيض الثانوي لها، على نظائر الشاردة والتي تم اعتراض تخليقها. وفي حال النجاح، تنتج

السلالة الطفرة (تسمى إيديوتروف) ناتج أيض ثانوي جديد. وقد استخدم التخليق التطفيري الحيوي لاكتشاف الكثير من نواتج الأيض الثانوي الجديدة. وكان الأكثر شهرة طارد الديدان التجاري الدورامكتين، واستخدم في إنتاجه السلالة المطفرة ستربتوميسيس أفيرميتيليس المنتجة للأفيرميكتين [٥٥] (انظر القسم ٥, ٨, ١).

ولتحسين السلالة، تم عملياً تجاهل التعديل الوراثي في الصناعة قبل عام ١٩٧٥م، وذلك يرجع أساساً إلى انخفاض معدل التعديل، منخفض مثل 10^{-6}. ومع ذلك، فقد غير استخدام اندماج محتوى الخلية البروتوبلازمي في الأكتينوميسيتات بوساطة البولي إيثيلين جليكول عن طريق أوكانيشي وآخرون [٥٦] الموقف بشكلٍ ملحوظ. فقد سرع عمل أوكانيشي في تكوين واندماج وتجديد محتوى الخلية البروتوبلازمي من استخدام التعديل الوراثي. ومنذ ذلك الحين، كان هناك اهتمام متزايد في تطبيق التعديل الوراثي في إنتاج المنتجات الميكروبية المهمة. وزادت معدلات التعديل إلى أكبر من 10^{-1} في بعض الحالات. وبعد عام ١٩٨٥م، اشتمل الكثير من برامج تحسين السلالة بشكل روتيني على (١) التطفير التحويلي، (٢) الحذف الاستهدافي والتضعيف عن طريق الهندسة الوراثية، و(٣) التعديل الوراثي باندماج محتوى الخلية البروتوبلازمي والتحول البلازميدي. وعرف الكثير عن علم الوراثة والتنظيم في الإكتينوميسيتات؛ بسبب البحوث الجيدة على ستريبتوميسيس كوليكولور بواسطة ديفيد هوبوود، وكيث شاتر، وميرفين بيب، وزملائهم في معهد جون إينيس في نورفيتش، إنجلترا (الذي يشار إليه أحياناً بمعبد "وراثة الإستربتوميسيتات") [٥٧]. وأنتج كائنهم المفضل ما لا يقل عن خمسة نواتج للأيض الثانوي (جزيء شبيه بالعامل أ، والمضادات الحيوية أكتينورودينات، أنديسيل بروديجيوسين، ميثيل نيوميسين أ، والمضاد الحيوي المعتمد على "الكالسيوم" أو CDA).

وكشفت هذه الجهود وغيرها بواسطة علماء الوراثة في الأوساط الأكاديمية والصناعة في جميع أنحاء العالم في السبعينيات والثمانينيات أن الجينات التي تشفر معظم مسارات التخليق للمضادات الحيوية تتجمع في أوبيرونات، مما يسهل نقل المسارات كلها من كائن إلى آخر. وقد وجد أيضاً أن هذه التجمعات تشمل جينات تنظيمية ومقاومة. وتمت ولادة علم "التخليق الحيوي الاندماجي" في عام ١٩٨٥م [٥٨]. وأسفرت الجهود الدولية من المملكة المتحدة، واليابان، والولايات المتحدة عن استنساخ مسار من أحد الإستربتوميسيتات الذي ينتج المضاد الحيوي الأيزو كرومانكينوني أكتينورودين في سلالات تنتج الجراناتيسين، والداي هيدرو جراناتيسين، والميديروميسين (والتي هي أيضاً أيزوكرومانكينونات). وأسفر ذلك عن اكتشاف مضادين حيويين هجينين جديدين، الميديررودين أ و الداي هيدروجراناتيرودين. وأصبح التخليق الحيوي الاندماجي تقنية تستخدم على نطاقٍ واسع لاكتشاف أدوية جديدة هجينة [٥٩] عن طريق تقنية الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل (rDNA). وخلقت أيضاً مضادات حيوية جديدة من خلال تغيير ترتيب الجينات لمسار مفرد في العائل الأصلي.

وقد شمل التقدم في تحسين السلالة مؤخراً الاستخدام الواسع لتقنيات وراثية جديدة مثل (١) الهندسة الأيضية، مما أدى إلى التحديد الكمي والتحكم في تدفق الأيض، ومتضمنةً الهندسة الأيضية العكسية وتحليلات التعبير النسخي، مثل التحليل الارتباطي والتسلسل التوقيعي المتماثل الضخم؛ (٢) التطور الموجه (انظر القسم ١,١١)، (٣) التكاثر الجزيئي بما في ذلك خلط الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي وخلط الخريطة الوراثية الكاملة (الجينوم)، و(٤) التخليق الحيوي الاندماجي. وتسهل هذه الجهود ليس فقط عزل سلالات محسنة، ولكن أيضاً توضيح وتحديد أهداف وراثية جديدة لاستخدامها في اكتشاف المنتج.

(١,٦) المضادات الحيوية شبه المخلقة لمكافحة الميكروبات المقاومة

Semi-Synthetic Antibiotics to Combat Resistante Microbes

على الرغم من وجود شعور عبر عنه كثيرون في أواخر السبعينيات بأن عصر اكتشاف منتجات للأمراض البكتيرية ينتهي، فقد استمرت المعركة ضد الميكروبات المقاومة وظهرت بعض التطورات المثيرة للدهشة. وشملت هذه: (١) التغييرات شبه التخليقية للمضادات الحيوية القديمة (الكيتوليدات، والكلاريثروميسين، والأزيثروميسين، والجليسيل جليسينات)؛ (٢) المضادات الحيوية القديمة غير المستغلة (تيكوبلانين)، (٣) مشتقات جديدة للمضادات الحيوية السابقة محدودة المدى (ستربتوجرامينات)؛ و(٤) عدد قليل من العوامل الحديثة المضادة للميكروبات (كاسبوفونجين، ودابتوميسين، والإيبوثيلونات التخليقية).

وكان تطوير الإريثروميسينات شبه المخلقة نجاحاً كبيراً [٦٠]. وشملت هذه الكلاريثروميسين، والروكسيثروميسين، والأزيثروميسين، والكيتوليد تيليثروميسين. وفي حين أظهر الأولان تحسناً في مقاومة الأحماض والتوفر الحيوي عن الاريثروميسين أ، فلم يظهرا أي تحسن ضد السلالات المقاومة. ومن ناحيةٍ أخرى، عمل الأزيثروميسين والتيليثروميسين ضد البكتيريا المقاومة للماكروليدات. وكانت كل هذه الإريثروميسينات شبه المخلقة فعالة ضد التهابات الجهاز التنفسي العلوي، ويمكن أن تعطى حقناً أو عن طريق الفم. وكان التيليثروميسين مثبطاً للبكتيريا، يعطى عن طريق الفم، وبالدرجة الأهم للالتهابات التنفسية المكتسبة في المجتمع. وكانت قدرته المنخفضة للطفرات المقاومة وكذلك لحث المقاومة المنتقلة على درجة خاصة من الأهمية. كما أنه لم يحفز مقاومة الـ MLS_B، والتي هي مشكلة في الماكروليدات الأخرى.

لأكثر من ٣٥ سنة، كان الجليكوببتيدان الفانكوميسين والتيكوبلانين تقريباً المضادان الحيويان الطبيعيان الوحيدان الفعالان ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام المقاومة للأدوية المتعددة. وقد تم تقليل استخدامهما؛ بسبب زيادة المقاومة للأدوية المتعددة. وأنقذ الموقف ظهور عدد من المضادات الحيوية شبه المخلقة، ومنها السينيرسيد. وتكون السينيرسيد من زوج تعاوني (بمائة ضعف) من الستربتوجرامينات ضيق المدى، وهما الكينوبرستين

والدالفوبرستين، وكلاهما يتم تصنيعه شبه تخليقياً من المركبات الطبيعية المنتجة من سلالة واحدة من إستربتوميسيس برستينسبيراليس [٦١]. ويتكون الزوج من (مجموعة أ) عديد ماكرولاكتون غير مشبع يحتوي على حلقة أوكسازول غير عادية وجزء داي إينيل أميد، و(مجموعة ب) هيكسا ديبسي ببتيد حلقية تحتوي على جزء ٣-هيدروكسي بيكولينويل خارج الحلقة. وعلى الرغم من أن الستربتوجرامينات الطبيعية كانت سيئة الذوبان في الماء ولا يمكن أن تستخدم عن طريق الوريد، إلا أن مكونات السينيرسيد كانت قابلية للذوبان في الماء. وقد منعا تخليق البروتين، وكانا نشطين ضد الإنتيروكوكس فاشيم المقاومة للفانكوميسين (VREF)، والستافيلوكوكسس أوريوس المقاومة للميثيسيلين (MRSA)، والستافيلوكوكسس أوريوس المقاومة للجليكوببتيد، والستافيلوكوكسس نيمونيا المقاومة للبيتا-لاكتام. ويرجع الفعل التعاوني للستربتوجرامينات إلى حقيقة أن الجزء ب منع ارتباط مركبات أمينو أسيل الحمض النووي الريبوزي الناقل بالريبوسوم، في حين أن الجزء أ منع تكوين الرابطة الببتيدية وشوه الريبوزوم، محفزاً ارتباط الجزء ب. وقد أجيز السينيرسيد من قبل هيئة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) في عام ١٩٩٩م.

وقد تم تطوير تتراسيكلين شبه مخلق، وهو الجليسيل جليسين بنجاح، لاستخدامه ضد البكتيريا المقاومة للتتراسيكلين [٦٢]. وكان ٩-رباعي البيوتيل جليسيل أميدو المشتق من المينوسيكلين، والذي يدعى التيجيسيكلين، نشطاً ضد البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام المقاومة، والبكتيريا اللاهوائية التي تمتلك آلية مقاومة حماية الريبوسوم أو آلية نشطة للتخلص من المضادات الحيوية.

(١,٧) منتجات الأيض الابتدائية The Primary Metabolites

حدد تطوير تخمير البنسيلين في الأربعينيات البداية الحقيقية لما يمكن أن يطلق عليه العصر الذهبي لعلم الميكروبيولوجيا الصناعية. وأشارت أعمال لويس باستور إلى أهمية نشاط الميكروبات غير الممرضة في النبيذ والبيرة لإنتاج الكحول. وأنتج هذا الإدراك عدد كبير من منتجات الأيض الابتدائي الميكروبي ذات الأهمية التجارية والتي تم إنتاجها بواسطة التخمير. يتضمن الأيض الابتدائي سلسلة مترابطة من التفاعلات الهدمية، والهدمية البنائية، والبنائية التي تتم بواسطة الإنزيمات، والتي توفر المركبات الوسيطة المخلقة حيوياً والطاقة، وتحول المرادفتن المخلقة حيوياً إلى جزيئات كبيرة أساسية، مثل الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي، والحمض النووي الريبوزي، والبروتينات، والدهون. وتتسم بالتوازن الدقيق ونادراً ما تتراكم المنتجات الوسيطة. وعن طريق الإخلال بتنظيم الأيض الابتدائي، تحققت زيادة إنتاجية مفرطة في الكثير منتجات الأيض الابتدائي في صناعة التخمير. تجارياً، كانت الأحماض الأمينية، والفيتامينات، ونيوكليوتيدات النكهة، والأحماض العضوية والكحولات أهم منتجات الأيض الابتدائي.

(١,٧,١) الأحماض الأمينية Amino Acids

بلغ إنتاج الأحماض الأمينية ٢,٣ مليون طن في عام ٢٠٠٢م. وكانت أكثر الأحماض أهمية والمصنعة على الأقل جزئياً عن طريق وسائل حيوية هي الجلوتامات (١,٦ مليون طن سنوياً)، حمض الليسين-هيدروكلوريك (٧٠٠٠٠٠ طن)، والثريونين (٧٠٠٠٠ طن)، والفينيل ألانين (١٣٠٠٠ طن، بما في ذلك عن طريق التخليق الكيميائي)، وحمض الأسبارتيك (١٠٠٠٠ طن مصنعة إنزيمياً)، والتربتوفان (٣٠٠٠ طن، بما في ذلك المصنعة إنزيمياً). وقد تحققت معدلات عالية بواسطة التخمير (على سبيل المثال، ١٧٠ جم/لتر حمض إل-ليسين-هيدروكلوريك).

تستخدم الجلوتامات أحادية الصوديوم (MSG) كمحسن قوي للنكهة. وقد اكتشف كينوشيتا، وأوداكا، وشيمونو في شركة كيوا هاكو كوجيو تخمير حمض الجلوتاميك في اليابان في عام ١٩٥٧م [٦٣]. ومن المثير للاهتمام أن مؤسس الشركة (الدكتور بنزابورو كاتو)، والذي كان مهتماً بالنظام الغذائي لسكان اليابان وحاول تقليل الاعتماد على الأرز، كلف كينوشيتا بمهمة إنتاج بروتينات قابلة للأكل عن طريق التخمير. وبدلاً من ذلك، جاء الباحثون بعملية تخمير تنتج حمض أميني خارج الخلية من مواد غير بروتينية. وكان هذا الاكتشاف الرئيس حاسماً بالنسبة لتطوير صناعة تخمير الأحماض الأمينية. وقد تم تصنيع الجلوتامات أحادية الصوديوم باستخدام أجناس عديدة من الكورينيباكتريوم والبريفيباكتريوم.

عادة، لا يتوقع حدوث زيادة إنتاجية مفرطة من حمض الجلوتاميك؛ بسبب التنظيم الرجعي. وتشمل ضوابط الجلوتامات الرجعية كبح إنزيمات الـ PEP-كربوكسيليز، السترات سينسيز، والـ NADP-غلوتامات ديهيردوجينيز، ويتم تثبيط الإنزيم الأخير أيضاً بالجلوتامات. ومع ذلك، فعن طريق خفض فعالية حاجز المرور إلى خارج الخلايا، تم ضخ الجلوتامات خارج الخلية، ومن ثمَّ السماح باستمرار تكوينها دون انقطاع. ويحرر إفراز الجلوتامات مسار التكوين من التنظيم الرجعي حتى تتراكم المستويات المفرطة.

وقد تم التأثير عمداً على إفراز الجلوتامات عن طريق معالجات مختلفة، مثل الحد من البيوتين في الكورينيباكتريوم جلوتاميكوم، وكانت كل السلالات المنتجة للجلوتامات بإفراط غير قادرة على إنتاج البيوتين. والبيوتين هو عامل مساعد لإنزيم أسيتيل-العامل المساعد أ كربوكسيليز وهو ضروري لتخليق الأحماض الدهنية. وقاد التقرير المفاجئ [٦٤] بأن إضافة البنسيلين إلى الخلايا المزروعة في تركيز عالٍ من البيوتين أدى إلى إفراز حمض الجلوتاميك شيو وزملاؤه [٦٥] لإفتراض (١) أن نمو البكتيريا المنتجة للجلوتامات بإفراط في وجود مستويات غير محدودة من البيوتين ينتج عنه حاجز نفاذية بغشاء الخلية يمنع نقل الحمض الأميني خارج الخلية، و(٢) أن تثبيط البنسيلين لتكوين جدار الخلية يغير خصائص نفاذية غشاء الخلية ويسمح للجلوتامات بالمرور خارج الخلية.

وقد تم اكتشاف القواسم المشتركة في مختلف المعالجات التي تنتج مستويات عالية من حمض إل-جلوتاميك ، وهي (١) الحد من البيوتين، (٢) إضافة البنسيلين، أو (٣) الأحماض الدهنية المقللة للتوتر السطحي (مثل توين-٦٠) إلى الخلايا في مرحلة النمو الإطرادي، وتم تدعيم آلية النفاذية بقوة [٦٦]. وعلى ما يبدو، أدت كل هذه المعالجات إلى غشاء سيتوبلازمي يفتقر إلى الدهون الفوسفاتية، والتي تحفز الخروج النشط للجلوتامات من الخلية. وقد تم تأييد هذا الرأي أيضاً باكتشاف أن الحد من الأوليئات في سلالة غير قادرة على إنتاج الأوليئات [٦٧]، والحد من الجلسرين في سلالة غير قادرة على إنتاج الجلسرين [٦٨] أسفرا عن إفراز الجلوتامات. وكان كل من الجلسرين والأوليئات مرادفات للدهون الفوسفاتية. ووجد لاحقاً أن الخلايا المنتجة للجلوتامات لديها انخفاض كبير في نسبة الدهون في الخلايا، وخاصة الدهون الفوسفاتية [٦٩]. وهكذا أصبح واضحاً أن إفراز مستويات عالية من الجلوتامات يتطلب (١) تثبيط النمو في وجود مصادر غير محدودة من الكربون والطاقة و(٢) التغير في جهد الغشاء نتيجة نقص البيوتين، أو الأوليئات أو الجلسرين، أو إضافة لعوامل معينة.

على الرغم من الأدلة المذكورة أعلاه، فقد تم نقض فرضية غشاء البلازما الراشح بواسطة بعض العلماء لصالح نظام محدد لإفراز الجلوتامات يتم تنظيمه بحالة الطاقة في الخلية. ويعزى عمل البيوتين إلى التأثير على عملية الأيض الوسيط، المرتبطة بنشاط الإنزيمات المخلقة للأحماض الدهنية. وأرجعت آراء إضافية ناقضة لفرضية النفاذية الإنتاج المفرط للجلوتامات إلى انخفاض نشاط إنزيم ألفا-كيتوغلوتارات ديهيدروجينيز نتيجة الحد من البيوتين أو عن طريق إضافة البنسيلين أو مواد التوتر السطحي. وفي عام ٢٠٠١م، تم تأييد فرضية تغيير النفاذية. وأظهرت المعالجات المختلفة المؤدية إلى الإنتاج المفرط للجلوتامات أنها تسبب زيادة نفاذية طبقة حمض الميكوليك في جدار الخلية [٧٠]. وتتميز البكتيريا المنتجة للجلوتامات بإفراط بغلاف خلوي خاص يحتوي على أحماض الميكوليك والذي يحيط بالخلية بأكملها كطبقة تركيبية، ويعتقد أنها تشارك في نفاذية المواد المذابة. وشكلت أحماض الميكوليك المؤسترة بالأرابينوجالاكتان ومشتقات حمض الميكوليك المرتبطة لا تساهمياً طبقة دهنية ثانية، وشكل الغشاء السيتوبلازمي الطبقة الأولى. وكما ذكر هؤلاء المؤلفون، تأخذ الآن "مفاهيم نفاذية جدار الخلية " كما استعملت في الأبحاث الأولى لإنتاج إل-جلوتامات لأكثر من أربعين عاماً مضت، معنى جديداً. وقدم نامبوثيري [٧١] الأدلة على أن التعبير المفرط أو عدم نشاط الجينات المشاركة في تخليق الدهون قد غير آلية إفراز الجلوتامات بشكلٍ كبير، وغير الخصائص الكيميائية والفيزيائية للغشاء السيتوبلازمي، وأن هذا كان ضرورياً لإفراز إل-جلوتامات. وقد أشاروا إلى "إن تغيير محتوى الدهون الفوسفاتية وحده يكفي لفعيل آلية إفراز إل-جلوتامات". وذكر أيضاً بوركوفيسي وكريمر [٧٢] أنه "ليس هناك شك في أن تحفيز إفراز الجلوتامات في الكورينيباكتريوم جلوتاميكوم يرتبط بصورة مباشرة أو غير مباشرة بالغشاء و/ أو كمال جدار الخلية".

حيث إن الجزء الأكبر من الحبوب المستهلكة في العالم يفتقر إلى إل-ليسين، أصبح هذا الحمض الأميني الأساسي منتجاً صناعياً مهماً. ويتم التحكم في مسار تخليق الليسين بشدة في كائن مثل بكتيريا إيشيريشيا القولون، ويتضمن هذا المسار ثلاثة إنزيمات أسبارتات كينيز، ويتم تنظيم كلٍ منها بمنتج نهائي مختلف (الليسين، الثريونين، والميثيونين). بالإضافة إلى ذلك، بعد كل نقطة تفرع في المسار، يتم تثبيط الإنزيمات الأولية بالمنتج النهائي لكلٍ منها. ومع ذلك، في الكائنات المخمرة لليسين (على سبيل المثال، طفرات الكورينيباكتريوم جلوتاميكوم وأنسابها)، يوجد أسبارتات كينيز واحد فقط، والذي تم تنظيمه من خلال التثبيط الرجعي المنسق بالثريونين والليسين. وبالإزالة الجينية لإنزيم هوموسيرين ديهيدروجينيز، تم تحويل سلالة برية من الكورينيباكتريوم المنتجة للجلوتامات إلى طفرة منتجة لليسين بإفراط، والتي لا يمكن أن تنمو إلا إذا تم إضافة الميثيونين والثريونين إلى البيئة الغذائية [٧٣].

وتم تشييد سلالات من إيشيريشيا القولون ببلازميدات تحمل أوبيرونات لتخليق الأحماض الأمينية. وقد تم أيضاً إنجاز التحول البلازميدي في الكورينيباكتريوم، والبريفيباكتريوم، والسيراتشيا بحيث أمكن استخدام تقنية الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل لتحسين هذه السلالات المنتجة للأحماض الأمينية التجارية [٧٤]. وكان مفهوم الهندسة الأيضية مفيداً بشكلٍ خاصٍ، أي التحسين المباشر لتكوين المنتج أو خصائص الخلية من خلال تعديل تفاعلات كيميائية حيوية معينة أو إدخال أخرى جديدة باستخدام تقنية الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل [٧٥، ٧٦]. وكان جوهرها هو دمج الأساليب التحليلية لقياس التدفقات والسيطرة على التدفقات بواسطة تقنيات حيوية جزيئية لتنفيذ التعديلات الوراثية المقترحة. وكشف تحليل التحكم الأيضي أن التدفق الشامل من خلال مسار أيضي يعتمد على عدة خطوات، وليس فقط تفاعل واحد محدد للمعدل [٧٧]. وأظهرت نتائج التدفق الأيضي لسلالة أصلية من الكورينيباكتريوم جلوتاميكوم وأربع طفرات محسنة منتجة لليسين زيادة الإنتاجية في سلسلة من ٢ , ١ – ٩ , ٢٤٪ بالنسبة لتدفق الجلوكوز [٧٨]. وتبين أن (١) مسار فوسفات البنتوز قد زاد، (٢) تدفق المسار الوسطي الكلي زاد ضعفين تقريباً عن طريق التنظيم المنسق لإضافة الكربوكسيل على المركبات ثلاثية الكربون ونزع الكربوكسيل من المركبات رباعية الكربون، (٣) التدفق النسبي لإنزيم أيزوسترات ديهيدروجينيز انخفض من ٨٣ إلى ٦٠٪، و(٤) زاد المطلوب من فوسفات نيكوتين أميد أدينين داي نيكليوتيد المختزل (NADPH) من ١٠٩ إلى ١٧٢٪.

ويمكن تقدير قيمة الهندسة الوراثية في المثال التالي في الإنتاج المفرط للثريونين. فعن طريق إدخال إنزيم الثريونين ديهيدراتيز المقاوم للتثبيط الرجعي وإدخال نسخ إضافية من الجينات المشفرة للإنزيمات المخلقة للأحماض الأمينية المتفرعة، حولت مجموعات مختلفة سلالاتها المنتجة لليسين أو الثريونين إلى سلالات منتجة

لـ إل-أيزوليوسين. فقد أنتجت سلالة معدلة من إيشيريشيا القولون (عن طريق تطفير سلالة لا تنتج الأيزوليوسين، واستنساخ أوبيرون الـ thrABC في نسخ إضافية، وتعطيل جين الـ tdh المحلل للثريونين، والتطفير لمقاومة التركيزات العالية من إل-ثريونين و إل-هوموسيرين) ٨٠ جم/ لتر إل-ثريونين في ١,٥ أيام بإنتاجية قدرها ٥٠٪ [٧٩].

(١,٧,٢) النيكليوتيدات Nucleotides

تطور الاهتمام التجاري بتخمير النوكليوتيدات؛ بسبب اكتشاف كونيناكا في اليابان أن بعض البيورينات ريبونوكليوزيد-٥َ-أحادية الفوسفات، مثل حمض الجوانيليك (GMP)، وحمض الإينوزينيك (IMP)، وحمض الزانثيليك (XMP) حسنت نكهة الأغذية والمشروبات والتوابل [٨٠، ٨١]. ومن المثير للاهتمام، أن الـ AMP ليس له أي نشاط من هذا القبيل. وتفوقت كثافة تحسين النكهة باستخدام هذه المركبات على الـ MSG بعدة مرات. وكان للمزيج من نوكليوتيدات النكهة مع MSG تأثيراً تآزرياً على تحسين النكهة. وقد تم تصنيع النيوكليوتيدات أساساً بالتحلل الإنزيمي للحمض النووي الريبوزي للخميرة، ولكن كانت هذه عملية مكلفة. ثم وجد أن طفرات سلالة الكورينيباكتريوم جلوتاميكوم المنتجة لحمض الجلوتاميك تنتج IMP، XMP [٨٢، ٨٣]. وبمزيدٍ من التطفير للسلالة المنتجة للـ IMP، فقد تم الحصول على سلالة يمكن أن تنتج مزيج من النيوكليوتيدات الأكثر قوة، IMP وGMP [٨٤]. وأصبح التخمير المباشر الطريقة المفضلة لهذه الصناعة [٨٥]، على الرغم من أن بعض الشركات أنتجت النيوكليوزيدات (الإينوزين والجوانوزين) عن طريق التخمير ثم حولتها إنزيمياً (عن طريق حفز الفسفوكينيز) إلى ٥َ-النيوكليوتيدات. وبلغ إنتاجَ ٥َ-نيوكليوتيدات النكهة حوالي ٤٠ جم/ لتر.

(١,٧,٣) الفيتامينات Vitamins

يتم تصنيع الفيتامينات بمعدل ٧٠٠٠٠ طن سنوياً بالتخليق الكيميائي والتخمير. وينتج الريبوفلافين بواسطة هاتين الطريقتين بمعدل سنوي قدره ٤٠٠٠ طن. وتنتج معظم الفطريات الريبوفلافين (فيتامين ب٢) بما يكفي لتلبية متطلبات نموها، ولكن القليل منها ينتج هذا الفيتامين بصورة مفرطة طبيعياً. وقد وجدت هذه القدرة على الإنتاج غير المحكوم للريبوفلافين في المقام الأول في نوعين من الفطريات، إريموثيكيوم أشبي وأشبيا جوسيبي. وقد تم اكتشاف الإنتاج الإفراطي في سلالات الأشبيا الطبيعية في عام ١٩٣٥م بواسطة جوليرموند وزملاؤه [٨٦]. وأشاروا إلى اللون الأصفر من مستعمرات كلٍ من الفطرين، مع كونه أكثر كثافة في حالة الإريموثيكيوم أشبي. في خلال مرحلة النمو الثابتة، تصبح تجويفات الخلية صفراء، وفي بعض الفجوات، لوحظت

نجيمات إبرية الشكل من بلورات الريبوفلافين. وأدى هذا إلى استخدام إريموثيكيوم أشبي للإنتاج الصناعي للريبوفلافين في مكونات علف الحيوان [٨٧].

في عام ١٩٤٣م، تلقى ويكرهام وزملاؤه في بيوريا NRRL/ مختبر وزارة الزراعة الأميركية سلالة أشبيا جوسيبي من روبنز، مدير الحديقة النباتية في نيويورك، وأعطوها الرمز NRRL Y-1056. وأنتجت هذه السلالة مستعمرات صفراء باهتة، ولكن في عام ١٩٤٤م، لاحظ ويكرهام وزملاؤه سلالة مختلفة ذات مستعمرات برتقالية لامعة [٨٨]. واستبدلت سلالة إريموثيكيوم أشبي في الصناعة بسلالة أشبيا جوسيبي الأكثر استقراراً [٨٩] والتي أنتجت، بعد المعالجة الجينية، أكثر من ٢٠ جم/ لتر من الفيتامين.

وقد تم تطوير عملية الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل للريبوفلافين في الكورينيباكتريوم أمونياجينز عن طريق الاستنساخ والتعبير المفرط لجينات تخليق الريبوفلافين الخاصة بالكائن وتسسلات جيناته البادئة [٩٠]. وأنتجت السلالة الناتجة ١٥ جم/ لتر ريبو فلافين في ثلاثة أيام. وأدت الهندسة الوراثية لسلالة باسيلس ساتليس التي تحتوي بالفعل على طفرات مقاومة لنظائر البيورين إلى إنتاج ١٥ جم/ لتر ريبوفلافين [٩١]. وتم إنتاج هذه السلالة من باسيلس ساتلس الرقيقة عن طريق إدخال نسخ متعددة من أوبيرون rib في موضعين مختلفين في الكروموسوم أو الصبغي، وتعبير هذه الأوبيرونات من البادئات القوية الموجودة في النهاية ٥' في موقع داخلي في الأوبيرون، مما جعل الطفرات المقاومة لنظائر البيورين تزيد من إنتاج الجوانوزين ثلاثي الفوسفات (GTP؛ مرادف) وطفرة مقاومة لنظير الريبوفلافين (روزفلافين) في rib، الذى أخل بتنظيم المسار بأكمله [٩٢]. وقد وجد أن الجين المحدد في هذه السلالة هو ribA، الذي يرمز كلٍ من ٤،٣-داي هيدروكسي-٢-بيوتانون-٤-فوسفات سينسيز (نصف النهاية-إن من RibA) وGTP-سيكلوهيردوليز (مجال النهاية-سي) [٩٣]. وزادت نسخة إضافية واحدة من RibA إنتاج الريبوفلافين بكثير عن ١٥ جم/ لتر ورفعت أيضاً العائد من السكر بنسبة ٢٥٪. ونتيجة لهذه الجهود، أصبحت سلالة باسيلس ساتلس مهمة للإنتاج الصناعي من الريبوفلافين.

يشكل تكوين فيتامين ب١٢ من البكتيريا ظاهرة قديمة جداً. ويعود المسار اللاهوائي إلى حوالي ٤ مليار سنة في حين تطور المسار الهوائي عندما أصبح غلافنا الجوي مخصباً بالأكسجين منذ حوالي ٢ مليار سنة [٩٤]. في أواخر الأربعينيات، اكتشف عالم في شركة ميرك [٩٥] أن سلالتي إستربتوميسس جريسيوس وبسودوموناس دينيتريفيكانس يمكنهما تكوين فيتامين ب١٢ [٩٦]. وأظهرت دراسات أخرى أنه يمكن أيضاً إنتاج الفيتامين من سلالة بروبيونيباكتريوم شيرماني، فضلاً عن غيرها من البكتيريا. أصبحت بسودوموناس دينيتريفيكانس وبروبيونيباكتريوم شيرماني هي الكائنات المنتجة صناعياً. وبلغ إنتاج فيتامين ب١٢ مستويات أعلى من ٢٠٠ ملجم/ لتر باستخدام بسودوموناس دينيتريفيكانس. وقد استخدم التخمير حصرياً بمعدل ١٢ طن/ السنة في

بداية عام ٢٠٠٠م. ويمكن أن يبدو هذا رقماً صغيراً، ولكن لا حاجة لأكثر منه، حيث إن فيتامين ب١٢ جزيء قوي جداً.

وفي وقتٍ ما، تم إنتاج حمض الأسكوربيك (فيتامين ج) عن طريق عزله من الليمون. واستبدل هذا عام ١٩٣٣م بتخليق رايخشتاين المكون من سبع خطوات [٩٧]، والتي شملت خطوة تخليقية. بعد التحويل الكيميائي للدي-الجلوكوز إلى دي-سوربيتول، استخدمت سلالة جلوكونوباكتر أوكسيدانس لتحويل هذا الأخير إلى إل-سوربوز. وبعد هذا تم تحويل إل-سوربوز في عدة خطوات كيميائية إلى حمض ٢-كيتو-إل-جولونيك (2-KLGA). ثم تم تحويل الـ 2-KLGA كيميائياً بواسطة حامض أو قاعدة لحمض الأسكوربيك. وكان العائد من الجلوكوز إلى 2-KLGA هو ٥٠٪. وقد تم استخدام عملية رايخشتاين لمدة ٧٠ عاماً، ولكن أصبحت عمليات التخمير المطورة حديثاً التي تحول الدي-جلوكوز، والدي-سوربيتول، أو إل-سوربوز إلى 2-KLGA تنافسية [٩٨].

واستخدمت بعض عمليات إنتاج فيتامين ج ميكروبيولوجياً سلالات مفردة مثل أنواع الجلوكونوباكتر، والأسيتوباكتر أو البسودوموناس. وشملت عمليات الزراعة المشتركة عملية تم تطويرها في الصين تعود إلى عام ١٩٦٩م، وتستخدم على نطاقٍ واسع هناك لتحويل دي-سوربيتول إلى 2-KLGA. وفي عملية أخرى، تم تحويل دي-جلوكوز إلى حمض ٢،٥-داي كيتو-د-جلوكونيك بواسطة سلالة إيروينيا أو أسيتوباكتر، والذي تم تحويله بعد ذلك إلى 2-KLGA بواسطة سلالة الكورينيباكتريوم [٩٩]. وشملت عملية أخرى مماثلة طفرات من الجلوكونوباكتر أوكسيدانس والباسيلس ميجاتيريوم [١٠٠]. وأنتجت سلالة مهندسة وراثياً من إيروينيا هيربيكولا ١٢٠ جم/لتر من 2-KLGA [١٠١]، في حين أن الجلوكونوباكتر أوكسيدانس المعدلة وراثياً أنتجت ١٣٠جم/لتر [١٠٢]. ويستخدم حمض الأسكوربيك في الصناعات الدوائية، والغذائية، وصناعة المشروبات، والأعلاف. ويصل الإنتاج السنوي إلى ١١٠٠٠٠ طن عن طريق التخليق والتخمير.

(٤,٧,١) الأحماض العضوية Organic Acids

لقد كانت الأحماض العضوية منتجاً مهماً للتقنية الحيوية. ويمكن العثور على الكثير من المعلومات عن تاريخ تخمير الأحماض العضوية في مقالات ميال [١٠٣]، وماتيي [١٠٤]، وروهر [١٠٥]، وماجنوسون و لازور [١٠٦]. وأهم الأحماض العضوية التجارية هي حمض الستريك وحمض الخليك وحمض اللاكتيك. وتوجد أيضاً عمليات تخمير لإنتاج حمض السكسينيك، والجلوكونيك، والأوكسالوجلوكونيك، والبيروفيك، والإيتاكونيك، والشيكيميك، والماليك، والبروبيونيك، والبيوتيريك، والأوكساليك، والكوجيك، والفوماريك،

والإريثروبيك، والترانس-إيبوكسي سكسينيك، والطرطريك، والأحماض ألفا- وأوميجا- ثنائية الكربوكسيل طويلة السلسلة.

ولإنتاج حمض الستريك أهمية تاريخية؛ نظراً لأنه كان عملية التخمير الأولى التي تم تطويرها. وقد أنتج حصرياً عن طريق العزل من الليمون. في عام ١٩١٦م، وصف إنتاج حمض الستريك بفطريات الأسبرجلس السوداء بواسطة تشارلز، وكوري [١٠٧]. وانضم كوري إلى شركة فايزر في بروكلين، نيويورك، وطور عملية إنتاج تجارية في عام ١٩٢٣م. وكانت براءات الاختراع المسجلة من فيرن باخ وآخرون [١٠٨، ١٠٩] عام ١٩٢٧م هي أساس إنتاج حمض السيتريك في إنجلترا في شركة جون وستيرج المحدودة. وقد تم تحسين العملية في الثلاثينيات بواسطة مجموعة رايستريك [١١٠] وبواسطة دوجلار وبريسكوت [١١١]. وقد تمت دراسة متطلبات سلالة أسبرجليس نيجر من المعادن المهمة بواسطة عدد من المجموعات بما فيها تومليسون وزملائه [١١٢]، وأديجا وآخرون [١١٣].

خلال السنوات الأولى، تم إنتاج الحمض فقط بطريقة الزراعة السطحية في دوارق للدراسات المختبرية وصواني للإنتاج التجاري. ومع ذلك، وجد أميلونج [١١٤]، وكلوفر وبيركين [١١٥] أن طريقة الزراعة المغمورة كانت أفضل. واعتمد المزيد من تطوير تخمير حمض الستريك إلى حدٍ كبير على عمل البروفيسور مارفن جونسون مع زميله ديفيد بيرلمان [١١٦]، وبينغ شو [١١٧] في جامعة ويسكونسن خلال السنوات نفسها التي ساهم فيها جونسون بشكلٍ كبير جداً في تطوير تخمير البنسيلين. وكان استخدام الدبس العكسي (دبس عالي الاختبار)، والمعالج للحد من محتواه من الحديد، رائداً من قبل مختبرات مايلز. وتم الحصول على طفرات منتجة لتركيزات أعلى من قبل مختبرات مايلز [١١٨]، وجيمس وآخرون [١١٩]، وهانان وآخرون [١٢٠].

ويتم إنتاج حوالي ١,٥ مليون طن من حمض الستريك من أسبرجليس نيجر سنوياً. وتستخدم العملية التجارية أسبرجليس نيجر في بيئات غذائية تفتقر إلى الحديد والمنجنيز. وقد ارتبط إنتاج المستوى العالي من حمض الستريك أيضاً بزيادة تركيز الفركتوز-٢،٦-ثنائي الفوسفات داخل الخلايا، وهو منشط لتحلل الجلوكوز. وهناك عوامل أخرى تساهم في زيادة إنتاج حمض الستريك مثل تثبيط إنزيم أيزوسترات ديهيدروجينيز بواسطة حمض الستريك، وانخفاض درجات الرقم الهيدروجيني المثلي للبيئة (١,٧-٢,٠). وفي ما يقرب من ٤-٥ أيام، تم تحويل الجزء الأكبر (٨٠٪) من السكر الموجود إلى حمض الستريك، وبلغت الإنتاجية نحو ١٠٠ جم/ لتر. وقد تم تطوير عمليات بديلة لإنتاج حمض الستريك من خميرة الكانديدا، وخاصة من المواد الهيدروكربونية. وكانت هذه الخمائر قادرة على تحويل إن-بارافينات إلى حمضي الستريك والأيزوستريك بإنتاجية عالية جداً (١٥٠-١٧٠٪ على أساس الوزن). وقد تم التوصل إلى إنتاجية تصل إلى ٢٣٠ جم/ لتر.

بكتيريا حمض الخليك هي بكتيريا سالبة لصبغة الجرام، وهوائية إجبارياً، وتضم أنواعاً من الأسيتوباكتر، والجلوكونوباكتر، والفراتوريا. وقد كان نشاطها كعوامل متلفة للنبيذ مشكلة منذ ما لا يقل عن ١٠٠٠٠ قبل الميلاد. ويعود استخدام الأسيتوباكتر سابأوكسيدانس في إنتاج الخل إلى ٤٠٠٠ قبل الميلاد. وفي الواقع، فإن الكلمة اللاتينية "خل" تعني النبيذ الحامض أو الحاد. ويتم إنتاج الخل، المحلول المائي لحمض الخليك، بطريقة أفضل بسلالات الجلوكونوباكتر والأسيتوباكتر [١٢١]. وقد تم تحويل محلول من الإيثانول إلى حمض الخليك حيث تعرض ٩٠-٩٨٪ من الإيثانول للهجوم، منتجاً محلولاً من الخل يحتوي على ١٢-١٧٪ من حمض الخليك. وقد تم إجراء الإنتاج الصناعي لحمض الخليك فقط عن طريق تحويل السكر حتى أواخر القرن السابع عشر عندما أصبح تقطير الخشب منافساً لعملية التخمير. ثم أصبح البترول مصدراً رئيساً لحمض الخليك المخلق. وتم تأسيس أول مصنع كيميائي لحمض الخليك في عام ١٩١٦م. واستخدم حمض الخليك المصنع تخميرياً في صناعة الأغذية. وبلغ إنتاج حمض الخليك ٧,٥ مليون طن سنوياً بواسطة التخليق والتخمير.

حالياً تتم عملية تخمير حمض الخليك في خطوتين حيث تحول خميرة سكارروميسس سيرفيسي الجلوكوز إلى الإيثانول، وتنتج بكتيريا الأسيتوباكتر أسيتي حمض الخليك من الإيثانول. وزاد استنساخ إنزيم ألدهيد ديهيدروجينيز من الأسيتوباكتر بولي أوكسوجينز على ناقل بلازميدي إلى الأسيتوباكتر أسيتي زيلينوم معدل إنتاج حمض الخليك بنسبة تزيد على ١٠٠٪ (١,٨ جم/لتر لكل ساعة إلى ٤ جم/لتر لكل ساعة)، والإنتاجية بنسبة ٤٠٪ (٦٨-٩٧ جم/لتر) [١٢٢].

وقد استخدمت مجموعة أخرى من الكائنات الحية لإنتاج حمض الخليك، وهي الكائنات اللاهوائية، واللاهوائية النامية في درجة حرارة عالية من جنس الكلوستريديوم. وفي عام ١٩٤٠م، عزل ويرينجا سلالة كلوستريديوم أسيتيكوم [١٢٣] والتي فقدت في وقتٍ لاحق. ولكن في عام ١٩٤٢م، عزل فونتين وآخرون [١٢٤] سلالة كلوستريديوم ثيرموأسيتيكوم والتي حولت السكر كمياً إلى حمض الخليك عبر مسار إيمبدين-مايرهوف إلى البيروفات، والتي تحولت بعد ذلك إلى الخلات. ونتيجة لذلك تم تحويل ١ مول من الجلوكوز إلى ٣ مولات خلات. وأظهرت التجربة مع هذا التخمير أن ٠,٨٥ جرام من حمض الخليك يمكن أن تنتج من ١ جرام من الجلوكوز [١٢٥] وتم تحقيق إنتاجية تبلغ ٨٣-١٠٢ جم/لتر باستخدام الطفرات المحسنة [١٢٦]. وقد جرى استعراض الإنتاج بواسطة كلوستريديوم ثيرموأسيتيكوم من قبل شيريان وآخرون [١٢٧].

وقد استخدم إنتاج حامض اللاكتيك لتأخير تلف الأغذية لعدة قرون، ولكن لم تعرف الطريقة التي يفعل هذا حتى اكتشاف باستور في عام ١٨٥٧م أن سبب هذا النشاط المناسب هو الكائنات الحية الدقيقة. وفي عام ١٨٧٨م، عزل جوزيف ليستر [١٢٨] المزرعة النقية البكتيرية الأولى على وجه الاطلاق والتي سماها باكتريوم

لاكتيس، والتي أعيد تسميتها لاحقاً لاكتوباسيلاس لاكتيس لاكتيس. وبكتيريا حمض اللاكتيك هي لاهوائيات موجبة لصبغة جرام، تنتج وتفرز حامض اللاكتيك في البيئة. وكانت بين أول الميكروبات المستخدمة في تصنيع الأغذية. حالياً، يستخدم حامض اللاكتيك في الصناعات الغذائية بوصفها مادةً حافظةً ومحسناً للنكهة، وكذلك في الصناعات الكيميائية والصيدلانية. ومن التطبيقات المهمة لحمض إل-لاكتيك صناعة البولي أكتيد (انظر القسم ١,٧,٦)، وكذلك مذيب الإيثيل لاكتات الحميد بيئياً. ويتم إنتاج حوالي ٢٥٠٠٠٠ طن من حامض اللاكتيك سنوياً.

وبالإضافة إلى بكتيريا حمض اللاكتيك، فإن الفطر ريزوباس هو أيضاً منتج للحمض. ويفضل أحياناً لأنه لا يتطلب إضافات مثل مستخلص الخميرة، ومنقوع شراب الذرة، أو الشرش، والتي تجعل استرداد المنتج مكلفاً. أيضاً، يخلق فطر الريزوباس أورايزي فقط الصيغة إل-(+) من حمض اللاكتيك، في حين تنتج معظم بكتيريا اللاكتوباسيلي صيغ مختلطة من الحمض. ويمكن لبعض اللاكتوباسيلي المعدلة إنتاج صيغ مفردة ولكن الإنتاجية تكون منخفضة. وأدى برنامج سداسي الخطوة لتحسين السلالة إلى سلالة ريزوباس أورايزي تنتج أكثر من ١٣٠ جم/لتر من حمض إل-(+)-اللاكتيك، واقترب العائد من الجلوكوز من ٩٠٪ [١٢٩].

على الرغم من أن معظم اللاكتوباسيلي تنتج صيغ مختلطة، إلا أنه تم عزل سلالة من لاكتوباسيلاس لاكتيس تنتج ١٩٥ جم/لتر من حمض إل-اللاكتيك من ٢٠٠ جم/لتر جلوكوز [١٣٠]. وتنتج سلالة معدلة من إيشيريشيا كولاي الصيغة البصرية النقية من حمض دي-لاكتيك من الجلوكوز مع عائد تقريباً مماثل للعائد النظري الأقصى (أي جزيئين من جزيء واحد من الجلوكوز) [١٣١]. وقد تم هندسة الكائن الحي عن طريق منع الجينات للمسارات المتنافسة والتي تشفر إنزيمات الفومارات ريدكتيز، الكحول/ألدهيد ديهيدروجينيز، والبيروفات فورمات ليز، وكذلك بطفرة في جين الأسيتات كينيز.

(١,٧,٥) الكحولات Alcohols

إن إنتاج الإيثانول هو على الأرجح أقدم عملية تخمير معروفة. وقد كان تحويل السكر في الفواكه والحبوب لإنتاج الإيثانول عملية مهمة قبل ٦٠٠٠ سنة منذ أيام السومريين والمصريين. وقد استخدمت بشكل رئيس حتى الثمانينيات لصناعة المشروبات الكحولية، وقد أصبحت في السنوات الأخيرة مصدراً أولياً ووقود مهماً ونظيفاً، وخصوصاً للسيارات. والإيثانول أيضاً له تطبيقات مثل: (١) مذيب في المختبر، والأدوية ومستحضرات التجميل، (٢) مادة مقللة للتوتر السطحي مساعدة في مستحلبات المياه-الزيت، و(٣) عامل مطهر ومعقم.

وكان جاي لوساك، في عام ١٨١٠م، الأول الذي ذكر الإيثانول وثاني أكسيد الكربون كمنتجات رئيسة لتكسير السكر بالخميرة (انظر المقالة الرائعة لشلينك [١٣٢]). وفي عام ١٨٣٧م، وصف الفيزيائي شارل كاجنيارد-لاتور خصائص خلايا الخميرة الموجودة في المشروبات المخمرة، بما في ذلك شكلها، وتكاثرها، وحاجتها لكلٍ من الكربوهيدرات المخمرة ومصدراً نيتروجينياً للتضاعف، والاختلاف بين خمائر إنتاج النبيذ وخمائر عملية تصنيع البيرة. وفي نفس الوقت تقريباً، وجد ثيودور شوان، الذين تدرب على الطب، أن الخمائر كانت مطلوبة للتخمير الكحولي. وقد تم تأكيد أعمال كاجنيارد-لاتور وشوان من قبل فريدريش تراوجوت كوتسينج، وهو صيدلي ومدرس جامعي. ومع ذلك، فقد تم رفض أعمال هؤلاء الرواد من قبل الكيميائيين بيرزيليوس، وليبج، وفوهلر، والذين اعتقدوا أن العملية في الطبيعة هي تفاعل كيميائي بحت. ومن المثير للاهتمام، أن واحداً من أشد المنتقدين للكيميائيين كان موريتز تراوبه، الذي كان طالباً لليبيج. واقترح أن التخمير يتم بواسطة المكونات الخلوية المؤكسدة والمختزلة والتي وصفها بأنها "متخمرات". وكان باستور في عام ١٨٦٠م هو الذي أثبت أن هناك حاجة تامة لخلايا الخميرة لتنفيذ سلسلة من التفاعلات الكيميائية (الحيوية). أخيراً، استطاع إدوارد بوخنر في عام ١٨٩٧م، بمساعدة شقيقه هانز، تخليق الإيثانول بدون خلايا، باستخدام مستخلصات الخميرة. ولهذا، فقد فاز بجائزة نوبل في الكيمياء عام ١٩٠٧م.

ويتم إنتاج الكحول الإيثيلي عن طريق تخمير السكريات (أو السكريات العديدة التي يمكن أن تتحلل إلى سكريات قابلة للتخمير) بواسطة سكارروميسس سيرفيسي في حالة السكريات السداسية، وكليفيروميسس فراجيليس أو أنواع الكانديدا الهشة مع سكر اللاكتوز أو سكر خماسي، على التوالي.

وقد تم اختيار سكارروميسس سيرفيسي وخمائر أخرى وتكييفها لتخمرات خاصة للإيثانول. وتضمنت خميرة الخباز (سلالات مختلفة للخميرة المضغوطة والجافة النشطة)، وخمائر النبيذ (بما في ذلك سلالات خاصة متجمعة لإنتاج الشمبانيا والسلالات المكونة لطبقات رقيقة لإنتاج نبيذ شيري فلور)، وخميرة الساكي، سلالات تخمير البيرة العلوي والسفلي (تتفاوت في درجة التجمع التي تحدث أثناء التخيمر)، وسلالات التقطير المستخدمة لإنتاج الكحول من حبوب النشا. ويتم إنتاج حوالي مليوني طن من الخميرة سنوياً للتقطير، والتخمير وصناعات الخبز. وقد اقتصر إنتاج المشروبات الكحولية على استخدام الكائنات الحية الدقيقة (مثل الخميرة) ولكن بالنسبة للكحول الصناعي والوقود فعادةً ما يتم عن طريق التخليق الكيميائي من النفط، وقد تغير هذا في نهاية المطاف لصالح الخمائر. وتحت الظروف المثلى، فإنه يتم الحصول على ما يقرب من ١٠-١٢٪ إيثانول من حيث الحجم من تخمير الخميرة في غضون خمسة أيام. وأدى هذا التركيز المرتفع إلى إبطاء النمو وتوقف عملية التخمير. وباستخدام خمائر خاصة (الساكي)، يمكن أن يستمر التخمير لتركيزات كحول تصل إلى٢٠٪ من حيث الحجم، ولكن تحققت هذه التركيزات فقط بعد أشهر من التخمير.

في عام ١٩٧٧م، كان إنتاج الخميرة للمشروبات، والوقود، ووقود الكحول ٢٠٪ أقل عنه بالتخليق الكيميائي. ومع ذلك، بحلول عام ١٩٨٤م، قدمت الخمائر الإيثانول بـ ٨٧٪ أكثر مما فعل التخليق الكيميائي. وواصلت نسبة الكحول الكلي المنتج بالخمائر الزيادة على مر السنين. بحلول عام ٢٠٠٦م، تم إنتاج ١٣,٢ مليون طن من الإيثانول من الذرة سنوياً في الولايات المتحدة عن طريق التخمير مقارنة مع ٠,٦٥ مليون طن بالتخليق الكيميائي. ونتيجةً لإزالة الرصاص من البنزين، تم استبدال الإيثانول كمزيج البنزين لرفع درجة الأوكتان للبنزين. وفي وقتٍ لاحق، تمت إضافته إلى البنزين كمركب أوكسجيني للحد من انبعاث ثاني أكسيد الكربون من خلال تحسين الأكسدة والأداء العام للبنزين. ويعزى ذلك إلى التخلص التدريجي من استخدام ميثيل-رباعي-بيوتيل الاثير (MTBE) كمركب أوكسجيني، كما قرر الكثير من المجالس التشريعية للولايات في الولايات المتحدة. وقد أنتج الكحول الإيثيلي في البرازيل من قصب السكر بمعدل يزيد على ٤ بلايين جالون سنوياً، وكان يستخدم إما كمزيج ٢٥٪ وإما كوقود نقي.

ويجري النظر في وقود الإيثانول المنتج من الكتلة الحيوية بوصفها وسيلة للمساعدة في الحد من تلوث الهواء الناجم عن استخدام البنزين من دون المساهمة في ظاهرة الاحتباس الحراري [١٣٣]، ولإنهاء اعتماد الولايات المتحدة على المصادر الأجنبية للنفط. ويمكن أن توفر المواد الخام في الولايات المتحدة ٢٠ مليار جالون من وقود الإيثانول. وقد تم تطوير عمليات جديدة لتحويل الكتلة الحيوية إلى الإيثانول وقد استخدمت تقنية الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل لتحويل إيشيريشيا القولون والسلالات وثيقة الصلة بها إلى منتجين أكفاء للإيثانول (عائد ٤٣٪، حجم/ حجم) [١٣٤]. وقد تم إدخال جينات إنزيمات الكحول ديهيدروجينيز الثاني والبيروفات دي كربوكسيليز من بكتيريا الزيموموناس موبيليس في إيشيريشيا القولون، وأصبحت النظام السائد لتجديد نيكوتين أميد داي نيكليوتيد (NAD). ومثل الإيثانول أكثر من ٩٥٪ من منتجات التخمر في السلالة المهندسة وراثياً. وأنتجت بعض سلالات إيشيريشيا القولون المهندسة وراثياً مايقرب من ٦٠ جم/ لتر من الإيثانول. وعن طريق استنساخ وتعبير الجينين نفسهما في بكتيريا كليبسيلا أوكسيتوكا، تمكنت السلالة المعدلة من تحويل السيليولوز البلوري إلى الإيثانول بعائد مرتفع عند إضافة إنزيم السيليوليز الفطري [١٣٥]. وكان العائد النظري الأقصى ٨١-٨٦٪، والإنتاجية مرتفعة حيث تم إنتاج ٤٧ جم/ لتر من الإيثانول من ١٠٠ جم/ لتر من السيليولوز.

وقد تم إعادة فحص البكتيريا مثل الكلوستريديا والزيموموناس لاستخدامها في إنتاج الإيثانول بعد سنواتٍ من الإهمال. ويحول الكلوستريديوم ثيموسيللوم، وهو بكتيريا لاهوائية تنمو في درجة حرارة عالية، سليولوز المخلفات (أي الكتلة الحيوية)، و السليولوز البلوري مباشرةً إلى الإيثانول، دون الحاجة لإنزيم السليوليز الفطري [١٣٦-١٣٩].

والبيوتانول هو كحول آخر يمكن أن يساعد في حل الاعتماد المتزايد على البترول كوقود السيارات [١٤٠، ١٤١]. وأدى استنساخ جينات adc للأوبيرون ace (التي تشفر إنزيم أسيتوأسيتات ديكربوكسيليز)، ctfA و ctfB (جينين يرمزان لإنزيم العامل المساعد-أ-ترانسفيراز) على بلازميد يحتوي على بادئ adc في كلوستريديوم أسيتوبوتيليكوم إلى زيادة تقدر بـ ٩٥٪ في إنتاج الأسيتون، وزيادة ٣٧٪ في البيوتانول، وزيادة ٩٠٪ في الإيثانول، وزيادة ٥٠٪ في عائد المذيبات من الجلوكوز، وإنتاج أقل من الأحماض بـ ٢٢-ضعف [١٤٢].

وقد تم تطوير سلالة إيشيريشيا قولون والتي تنمو على الجلوكوز وتنتج ٣،١-بروبان دايول (PDO؛ جليكول ثلاثي الميثيلين؛ 3G) بحوالي ١٣٥ جم/لتر، مع عائد قدره ٥١٪ وبمعدل ٣,٥ جم/لتر لكل ساعة [١٤٣]. وقد بذل هذا الجهد المشترك بواسطة علماء من جينينكور الدولية ودوبونت وقد تحقق عن طريق إدخال ثمانية جينات جديدة لتحويل فوسفات الديهيدروكسي أسيتون (DHAP) إلى PDO. وشملت هذه جينات الخميرة التي تحول الديهيدروكسي أسيتون إلى الجلسرين، وجينات الكلبسيلا نيمونيا التي تحول الجلسرين إلى PDO. وحسن الباحثون الإنتاج في السلالة المعدلة من خلال تعديل ١٨ جين لإيشيريشيا القولون، بما في ذلك الجينات التنظيمية. وكان الـ PDO هو الوحدة البنائية المستخدمة للتخليق الكيميائي لألياف البولي يوريثان والبوليستر Serono™ بواسطة دوبونت (انظر القسم ٦,٧,١). كما استخدم الـ PDO كمادة تشحيم شبيهة بالبولي جليوكول وكمذيب.

والكحولات الأخرى التي يمكن أن تنتج عن طريق التخمير هي الجلسرين، والإريثريتول، والمانيتول، والألسوربيتول، والزيليتول.

(٦,٧,١) البوليمرات Polymers

يتم إنتاج ثلاثين ألف طن من السكر العديد الزنثان سنوياً لاستخدامها في مجال النفط، والصيدلانيات، ومستحضرات التجميل، والورق، والطلاء، والصناعات النسيجية. وزادت المعالجة الوراثية من إنتاجية الزنثان بضعفين، وزاد محتوى البيروفات بنسبة ٤٥٪ [١٤٤]. وزاد استنساخ الجينات التي أكملت طفرات الزنثان السالبة في السلالة الأصلية زانثوموناس كامباستريس من إنتاج الزنثان بنسبة ١٥٪ [١٤٥].

وقد تم تقديم حل لآثار التلوث بالمواد البلاستيكية المنتجة كيميائياً بواسطة مجموعة من المواد البلاستيكية القابلة للتحلل الطبيعي والمنتجة ميكروبياً، والمعروفة باسم بولي هيدروكسي ألكانوات (PHAs). وأصبح واحد من الـ PHA، البولي هيدروكسي بيوتيرات، متوفراً من الكائنات الحية الدقيقة في الثمانينيات [١٤٦]. وتتراكم الـ PHAs داخل الخلية إلى مستويات تصل إلى ٣٠-٨٠٪ من الوزن الجاف للخلايا الخلية وتصل تحت ظروف معينة في سلالة ألكاليجينس أوتروفس إلى ٩٦٪ من مادة الخلية [١٤٧].

ومن البلاستيكات الحيوية الجديدة البولي تراي ميثيلين تيرفثالات (البوليستر 3GT؛ 3G+)، المصنع بتفاعل حمض التيرفثاليك مع الـ PDO المنتج تخميرياً [١٤٨]. والـ 3G+ هو بوليستر جديد صديق للبيئة. والبولي أكتيد هو من البلاستيكات الأخرى الصديقة للبيئة ويصنع كيميائياً من حمض إل-(+)-لاكتيك المنتج تخميرياً [١٤٩].

(١,٧,٧) السكريات التخصصية، وكحولات السكر، إل-سكريات، سكريات الأوليجو، السكريات العديدة الجديدة التي تفرز خارج الخلية، الصبغات الحيوية، مستحضرات التجميل بما في ذلك العطور، والإنزيمات الميكروبية للتخليق الفراغي وغيرها من التطبيقات

Specialty Sugars, Sugar Alcohols, L-Sugars, Oligosugars, Novel Extracellular Polysaccharides, Biopigments, Cosmetics Including Fragrants, and Microbial Enzymes for Chiral Synthesis and Other Applications

يعد إل-ريبولوز من السكريات التخصصية المهمة [١٥٠] والذي يمكن تصنيعه بالتحويل الحيوي، أي نزع الهيدروجين من الريبيتول. ثم يتم تحويل هذا المركب إلى إل-ريبوز الذي يستخدم لتخليق نظائر الينوكليوزيدات كعوامل مضادة للفيروسات. والدكستران هو سكر عديد متماثل من الجلوكوز، يتم إفرازه بواسطة سلالات الليوكونوستوك، والإستربتوكوككس، واللاكتوباسيلس. ويمكن إنتاج الدكستران باستخدام إنزيم الدكستران سكريز [١٥١]. وقد استخدمت مستحضرات التجميل (منتجات العناية الشخصية) بواسطة قدماء المصريين، والإغريق، والرومان، والأنكا والأزتيك منذ قرون، وتستخدم على نطاقٍ واسع اليوم [١٥٢]. وهي تشمل حمض الهيالورونيك، والكيتوزان، والزانثان، والسيراميدات، والأحماض الأمينية، والإكتوينات، والبروفيتامينات، وثنائي هيدروكسي الأسيتون، وسم الكلوستريديوم بوتيولينوم، والأحماض العضوية، والدكسترينات الحلقية، والمستحلبات الحيوية، وصبغة الإنديجو، والصبغات الحيوية، والأحماض الدهنية، والإنزيمات الميكروبية. ومن الصبغات الحيوية المهمة الريبوفلافين، وبيتا-كاروتين، والأزتاكسانثين، والزياكسانثين، والموناسين. وتشمل العطور الحيوية رائحة الخوخ ٤-ديكالاكتون، ورائحة الزبدة أر-جاما-دوديكانوليد، وروائح الجبن حمض البيوتيريك وإستراته الإيثيلية [١٥٣]. وقد استخدم التحفيز الحيوي (انظر الأقسام ١,١٢ و١,١٣) على نطاقٍ واسعٍ في مجالات المواد الكيميائية الدقيقة والضخمة، وكذلك في القطاع البيئي [١٥٤، ١٥٥].

(١,٨) التحول من المضادات الحيوية إلى العوامل الدوائية

The Shift from Antibiotics to Pharmacologic Lagents

لقد طورت الطبيعة خلال الثلاث مليارات عام التي استوطنت فيها البكتيريا الأرض كيمياء فريدة من نوعها في شكل مئات الآلاف من نواتج الأيض الثانوي الجديدة المعرفة والمعزولة. وقد حققت هذه المنتجات

الطبيعية، بتركيباتها الفراغية الأكثر تعقيداً من تلك المواد الكيميائية المخلقة، نجاحاً ساحقاً في استخدامها من قبل البشر. وقد قللت نواتج الأيض الثانوي للكائنات الحية الدقيقة من الألم والمعاناة، وحققت ثورة في الطب. وقد كانت المنتجات الطبيعية أهم العوامل المضادة للعدوي والمضادة للسرطان. وتمت نمذجة مثبطات إنزيمات الترانسكريبتيز العكسي والبروتييز لفيروس نقص المناعة البشرية والمستخدمة معاً لمكافحة الإيدز بناءً على الإرشادات التي تم الحصول عليها من المنتجات الطبيعية في المعهد الوطني للسرطان في الولايات المتحدة. وتم الحصول على العامل المضاد للجدري الأسيكلوفير والسيترابين، ودواء الأورام اللمفاوية غير-الهودجكينية، من الإسفنج. وفي مطلع هذا القرن، كان أكثر من نصف الأدوية المعتمدة المتاحة إما منتجات طبيعية وإما مرتبطة بها، وتلك التي لم تشمل حتى مواد حيوية مثل اللقاحات والأجسام المضادة أحادية النسيلة.

ومن بين جميع المنتجات التقليدية المنتجة تخميرياً، فإن نواتج الأيض الثانوي (الإيديوليتات) تعدُّ هي الأكثر أهمية لصحة الإنسان. وهي (١) غالباً ما تنتج في مرحلة تطويرية تالية للنمو في مزرعة على دفعة واحدة (الإيديوفيز، مرحلة إنتاجها) (٢) ليس لها وظيفة في النمو، (٣) يتم إنتاجها من قبل مجموعات تصنيفية ضيقة من الكائنات الحية، (٤) لديها تركيبات كيميائية غير عادية ومتنوعة، و(٥) غالباً ما تتشكل كخليط من مركبات عائلة كيميائية مرتبطة ارتباطاً وثيقاً. وفي الطبيعة تعمل وظائفها على بقاء السلالة، ولكن عند نمو الكائنات الحية المنتجة في مزرعة نقية، فإنه ليس لنواتج الأيض الثانوي أي دور من هذا القبيل. وهكذا، يتم فقدان القدرة على الإنتاج في الصناعة بسهولة بواسطة الطفرة ("تحلل السلالة"). وبشكلٍ عام، فإن نواتج الأيض الابتدائي والثانوي ذات الاهتمام التجاري لها أوزان جزيئية منخفضة نسبياً، أي أقل من ١٥٠٠ دالتون.

وفي حين أن الأيض الابتدائي يكون في الأساس واحداً بالنسبة لجميع الأنظمة الحية، فإن الأيض الثانوي يجري أساساً في النباتات والكائنات الدقيقة، وعادةً ما يكون متخصص للسلالة. وتعد المضادات الحيوية هي أفضل النواتج المعروفة للأيض الثانوي، كما نوقش أعلاه.

في النصف الأخير من القرن العشرين، تم وضع المزيد من الاهتمام على استخدام منتجات الأيض الثانوية الميكروبية كعوامل دوائية. ولم يعد ينظر للمصادر الميكروبية وحدها كحلول محتملة للأمراض الميكروبية. فقد بدأ هاماو أوميزاوا (الشكل رقم ١٠ , ١)، برؤية عظيمة، في الستينيات جهوده الرامية إلى توسيع نطاق الميكروبيولوجيا الصناعية إلى نواتج الأيض الثانوية منخفضة الوزن الجزيئي، والتي كان لها تأثيرات، أخرى/ أو بالإضافة إلى التأثير المضاد للبكتيريا، والمضاد للفطريات، والمضاد للسرطان. وركز وزملاؤه في معهد الكيمياء الميكروبية في طوكيو على مثبطات الإنزيمات [١٥٦، ١٥٧]، وعلى مر السنين، اكتشف، وعزل، ونقي، ودرس النشاط للعديد من هذه المركبات الجديدة في التجارب المعملية وداخل الحيوانات. وأجريت جهود مماثلة في معهد كيتاساتو في طوكيو

بواسطة ساتوشي أومورا [١٥٨]. وأعقب هذا التغيير في فلسفة الفرز والاختيار تطبيقات عبقرية للبيولوجيا الجزيئية للكشف عن تأثير المركبات من الميكروبات والنباتات للتطبيقات غير المضادات الحيوية.



الشكل رقم (١٠, ١). هاماو أوميزاوا.

(١, ٨, ١) مثبطات الإنزيمات Enzyme Inhibitors

إن أهم مجموعة من مثبطات الإنزيمات هي الستاتينات، وتستخدم لخفض الكوليستيرول في البشر. ولهذه العوامل الناجحة للغاية أيضاً نشاطاً مضاداً للفطريات، وبخاصة ضد الخمائر. واكتشف كلٍ من براون وزملاؤه في المملكة المتحدة [١٥٩] وإندو في اليابان [١٦٠]، بشكلٍ مستقل، أول عضو في هذه المجموعة، الكومباكتين (ميفاستاتين، ML-236B)؛ كمضاد حيوي منتج من البنسيليوم بريفيكومباكتوم و البنسيليوم سيترينوم. واكتشف إندو وزملاؤه الكومباكتين في المحاليل كمثبط لإنزيم العامل المساعد-أ ٣-هيدروكسي-٣-ميثيل جلوتاريل ريدكتيز، الإنزيم المنظم والمحدد لمعدل تكوين الكوليسترول. وفي وقتٍ لاحق، وبشكلٍ مستقل، اكتشف إندو [١٦١] وألبرتس وزملاؤه [١٦٢] (في شركة ميرك، الولايات المتحدة الأمريكية)، الصورة الميثيلية الأكثر نشاطاً من الكومباكتين المعروفة باللوفاستاتين (موناكولين ك، ميفينولين) في محاليل مزارع المونوسكس روبر والأسبرجلس تيريوس، على التوالي.

وقد أنتج اللوفاستاتين (ميفينولين) بواسطة فطر الأسبرجلس تيريوس وكان مثبطاً تنافسياً قوياً لإنزيم العامل المساعد-أ ٣-هيدروكسي-٣-ميثيل جلوتاريل ريدكتيز من الكبد في صورة حمضه الهيدروكسي (حمض

المفينولينيك). ومهد اللوفاستاتين الطريق إلى تطوير البرافاستاتين، والزوكور (سيمفاستاتين)، والليبيتور (أتورفاستاتين). وقد أنتج البرافاستاتين بواسطة التحويل الحيوي، أي إضافة مجموعة الهيدروكسيل للكومباكتين باستخدام أكتينوميسيتات مثل إستربتوميسيس كاربوفيلوس [١٦٣] ونوع من الأكتينوماديورا [١٦٤]. ومن الجدير بالذكر أن الآلية الإنزيمية للسلالتين وجد أنها مختلفة تماماً [١٦٥]. وقد تم تحضير الزوكور شبه تخليقياً من اللوفاستاتين، في حين تم تخليق الليبيتور بالتخليق الكلي، على غرار تركيب الستاتينات الأخرى.

وقد وجد أن الستاتينات تثبط إنتاج الكوليسترول من البداية في الكبد، المصدر الرئيسي لكوليسترول الدم. ويؤي ارتفاع نسبة الكوليسترول في الدم إلى تصلب الشرايين الذي يعد عاملاً مسبباً لأنواع عديدة من أمراض القلب التاجية، وهي سبب رئيس لوفاة الإنسان. وكانت الستاتينات نجاحاً؛ لأنها خفضت الكوليسترول الكلي في البلازما بنسبة ٢٠-٤٠٪، في حين خفضتها الفايبرات المستخدمة سابقاً بنسبة ١٠-١٥٪. ولم تكن الستاتينات فقط مفيدة في خفض خطر الأمراض القلبية الوعائية، ولكنها منعت أيضاً السكتة الدماغية، وقللت من أمراض الأوعية الدموية الطرفية، وكان لها نشاط مضاد للتجلط ومضاد للالتهابات. ولذلك يتضح لنا لماذا أصبحت هذه المجموعة من المركبات الأدوية الرائدة في مجال صناعة الأدوية.

وأدى مسح مضادات الإنزيمات أيضاً إلى اكتشاف السكر الرباعي الزائف الأكاربوز، المثبط الطبيعي لإنزيمات ألفا-جلوكوزيديز والسكريز المعوية [١٦٦]. ويتم إنتاج الأكاربوز بواسطة أكتينوميسيت من جنس أكتينوبلانيس. وهو يخفض ارتفاع سكر الدم وتخليق الجلسرين ثلاثي الأسيل في الأنسجة الدهنية والكبد والجدار المعوي للمرضى الذين يعانون من مرض السكري والسمنة وارتفاع دهون الدم من النوع الرابع. وتشمل مثبطات الإنزيمات القيمة الأخرى الليبستاتين، المستخدم لمكافحة السمنة والسكري عن طريق تثبيط امتصاص الجهاز الهضمي للدهون. وكان مثبطاً لإنزيم الليبيز الذي يفرزه البنكرياس وينتج بواسطة إستربتوميسس توكسيتريسيني. ويدعى المنتج التجاري أورليستات (تيتراهيدروليبستاتين) [١٦٧].

وتم في هذا الوقت اكتشاف مثبط إنزيمي مهم جداً للطب يسمى حمض الكلافيولانيك [١٦٨] (انظر القسم ١,٣)، والكثير منها للزراعة مثل البولي أوكسينات [١٦٩] والفوسفينوثريسينات (انظر القسم ١,٨,٥). والبولي أوكسينات هي عوامل مضادة للفطريات تحول دون تكوين الجدار الخلوي عبر تثبيط إنزيم الكيتين سينثيتيز.

وأصبحت مثبطات امتصاص المعادن أيضاً مهمة. أحدها، ويدعى الديسفيرال، وهو حامل للحديد ينتج بواسطة إستربتوميسس بيلوسوس، وكان يستخدم في مرض تراكم الحديد (هيموكروماتوزيس) وتراكم الألمنيوم في مرضى الغسيل الكلوي [١٧٠].

(٢, ٨, ١) مثبطات المناعة Immunosuppressants

قادت مفاهيم أوميزاوا أيضاً إلى تطور مثبطات المناعة المهمة للغاية، مثل السيكلوسبورين، والتاكروليماس، والسيروليماس، وحمض الميكوفينوليك، والتي أحدثت ثورة في مجال زراعة الأعضاء. واكتشف السيكلوسبورين (المعروف بدايةً بالسيكلوسبورين أ) أصلاً كمبتيد مضاد للفطريات محدود المدى وينتج بالفطر توليبوكلاديوم نيفيوم (سابقاً توليبوكلاديوم إنفلاتوم) [١٧١]. وأدى اكتشاف نشاطه المثبط للمناعة إلى استخدامه في زراعة القلب والكبد والكلى، وإلى النجاح منقطع النظير لمجال زراعة الأعضاء.

وعلى الرغم من أن السيكلوسبورين كان المنتج الوحيد في السوق لسنواتٍ عديدة، إلا أن منتجين آخرين من الأكتينوميسيتات قدما مزيداً من الفرص. وكانا السيروليماس (الراباميسين) والتاكروليماس (FK-506). وكان كلاً منهما عامل متعدد الكيتيدات مضاد للفطريات محدود المدى، وكانا ١٠٠-ضعف أكثر فعالية من السيكلوسبورين كمثبط للمناعة وأقل سمية.

واكتشف السيروليماس بواسطة مجموعة صغيرة من العلماء في مختبرات إيريست في مونتريال، كندا، تحت قيادة كلود فيزينا [١٧٢]. في عام ١٩٦٤م، سافرت بعثة علمية كندية إلى جزيرة الفصح (رابا نوي) في جنوب المحيط الهادئ لجمع عينات من التربة والنباتات. ولحسن الحظ، تبادلوا عينات التربة مع فريق إيريست، وفي عام ١٩٧٢م، عزل الفريق الأخير السيروليماس (وسمي الراباميسين في ذلك الوقت) من إستربتوميسس هيجروسكوبيكس. وأظهر هذا الجزيء الفريد نشاطاً قوياً ضد الخميرة الممرضة كانديدا ألبيكانس والخمائر الأخرى. وبسبب جهود سورين سيجال، فقد وجد لاحقاً أن له نشاطاً كمثبط للمناعة وكمضاد للسرطان [١٧٣]. وتم تسجيل براءة إختراع الراباميسين في عام ١٩٧٥م، ولكن بسبب عدم الاهتمام من الشركات، لم يتم تسويقه كعامل لتسهيل عمليات زرع الأعضاء حتى عام ١٩٩٩م. ولم يظهر السيروليماس سمية السيكلوسبورين والتاكروليماس على الكلى، وكان له نشاطاً تآزرياً مع كلٍ منهما في الفعل المثبط للمناعة. ووجد الدواء استخداماً جديداً في طب القلب عندما استخدم في نقع الدعامات القلبية بسبب أن الدعامات المنقوعة في السيروليماس كانت أقل عرضة للتكاثر والضيق الرجعي، والتي تحدث عادة بعد علاج مرض الشريان التاجي.

وقد ساعدت الاكتشافات في ١٩٩١-١٩٩٣م من قبل بايفا وزملاؤه [١٧٤-١٧٦]، والخاصة بالمرادفات التخليقية للسيروليماس (مثل: الخلات، البروبيونات، الميثونين، حمض البيبيكوليك، حمض الشيكيميك) على تطوير الإنتاج التخميري للسيروليماس وإنتاج نظائر جديدة من هذا الجزيء المتعدد القوة.

اكتشف التاكروليماس من قبل شركة فوجيساوا للأدوية (الآن أستيلاس) [١٧٧]، ولكن تم التخلي عنه تقريباً بعد أن أظهرت الدراسات الأولية على الحيوانات سمية مرتبطة بالجرعة. ومع ذلك، جرب الدكتور توماس

ستارزل من جامعة بيتسبرغ جرعات مخفضة، وذلك بعد أن أدرك أن مثبط المناعة كان ٣٠-١٠٠ مرة أكثر نشاطاً من السيكلوسبورين، والتي كانت فعالة للغاية وغير سامة، وعليه أنقذ الدواء وكثير من المرضى بعد ذلك، خصوصاً الذين لم يستجيبوا للسيكلوسبورين. ومنذ إدخاله عام ١٩٩٣م في اليابان و١٩٩٤م في الولايات المتحدة، استخدم التاكروليماس في زراعة الكبد، والكلى، والقلب، والبنكرياس، والرئة، والأمعاء، وفي منع مرض الدعامة-مقابل-العائل. وقد أظهر مستحضراً موضعياً نشاطاً قوياً ضد التهاب الجلد الإكزيمي وهو المرض الجلدي واسع الانتشار.

ويمتلك مضاد حيوي واسع المدى قديم جداً وهو حمض الميكوفينوليك تاريخاً مدهشاً. وكان بطل القصة المجهول هو الطبيب الإيطالي بارتولوميو جوسيو، الذي اكتشف المركب في عام ١٨٩٣م [١٧٨]. وعزل جوسيو فطر من الذرة الفاسدة، والذي أسماه البنسليوم جلاوكوم، والذي أعيد تصنيفه لاحقاً بنسليوم بريفيكومباكتوم. وعزل بلورات المركب من رشيح المزرعة في عام ١٨٩٦م ووجد أنها تمنع نمو بكتيريا الجمرة الخبيثة. وكانت هذه هي المرة الأولى التي تم فيها بلورة مضاداً حيوي، والمرة الأولى التي أظهر فيها مركباً نقياً نشاطاً مضاداً حيوياً. ودخل العمل في طي النسيان، ولكن لحسن الحظ تم إعادة اكتشاف المركب من قبل آلسبيرغ وبلاك في عام ١٩١٣م [١٧٩]، وأعطى الاسم حمض الميكوفينوليك. واستخدموا سلالة معزولة أصلاً من الذرة الفاسدة في إيطاليا تدعى البنسليوم ستولونيفيرم، مرادفة للبنسليوم بريفيكومباكتوم. وتم توضيح التركيب الكيميائي بعد سنوات عديدة من قبل رايستريك وزملاؤه في إنجلترا. ويمتلك حمض الميكوفينوليك نشاطاً ضد للفطريات، والفيروسات، والسرطان، ومرض الصدفية، وهم مثبط للمناعة. ولم يتم مطلقاً تسويقه بوصفه مضاداً حيوياً؛ بسبب سميته، ولكن تمت إجازة مركبه ٢-مورفيلينو إيثيل أستر كمثبط مناعي جديد لعمليات زراعة الكلى في عام ١٩٩٥م وزراعة القلب في عام ١٩٩٨م. ويدعى إستر ميكوفينولات موفتيل (CellCept) وهو دواء مساعد والذي يتحلل لحمض الميكوفينوليك في الجسم.

(١,٨,٣) مضادات السرطان Antitumor Agents

أصبحت المنتجات الطبيعية هي الأدوية الكيميائية الرئيسة ضد السرطان. تم عزل السيتارابين (Cytostar®) المستخدم لعلاج الأورام اللمفاوية غير-الهودجكينية من الإسفنج [١٨٠]. وكانت معظم المركبات المهمة الأخرى المضادة للسرطان منتجات أيض ثانوية ميكروبية. وشملت الأكتينوميسين د، الميتوميسين، البليوميسين، والأنثراسيكلينات الداونوروبيسين والدوكسوروبيسين. وأعطى لحاء شجرة يي الباسيفيكية (تاكسوس بريفيفوليا) التاكسول (باكليتاكسيل)، مثبت الأنيبيبات الدقيقة، والذي اكتشفه وال وواني [١٨١] وذو النشاط

الممتاز ضد سرطان الثدي والمبيض. وكان إنتاجه أيضاً من قبل الفطريات الداخلية المعزولة من نفس المصدر ذي أهمية خاصة [١٨٢]. وكان التاكسول هو الدواء الأول المضاد للسرطان والذي يعمل من خلال منع تحلل الأنيبيبات الدقيقة. وكان الكامباتوثيسين مركباً نباتياً آخر اكتشفه وال وواني واستخدم لمرضى السرطان [١٨١].

لعددٍ من السنوات، عمل العلماء على مفهوم "الرصاصة السحرية"، والذي يستخدم الأجسام المضادة أحادية النسيلة الخاصة بخلايا الأورام لجلب عوامل العلاج الكيميائي السامة جداً في اتصال حميم مع خلايا الورم، وعليه توفر طريقة محددة، ونأمل أن تكون آمنة، لقتل هذه الخلايا. وشملت المشكلات: التخصصية الأقل من المطلوب، والمضاعفات المناعية، والتغلغل الضعيف لمزيج الجسم المضاد أحادية النسيلة-السم في الخلايا السرطانية. ومع ذلك، كان الجمع بين الأجسام المضادة أحادية النسيلة مع عوامل العلاج الكيميائي واعداً. ففي التسعينيات، تم ربط الدواء المضاد للأورام، كالسيأميسين، السام المنتج ميكروبياً كمركب إينيدين إلى الأجسام المضادة أحادية النسيلة المؤنسنة، وتم الموافقة على استخدامها ضد سرطان الدم النخاعي الحاد (AML) [١٨٣]. وتم تصميم الجسم المضاد أحادي النسيلة لتوجيهه إلى مولد الجسم المضاد CD33، وهو بروتين يعبر في خلايا سرطان الدم النخاعية. وسمي المزيج الميلوتارج (أو جيمتوزوماب أوزوجاميسين). وأصبح منتجاً تسويقياً في مارس عام ٢٠٠١م.

(١,٨,٤) قلويدات الإرجوت Ergot Alkaloids

أدى الفحص الواسع إلى تطوير قلويدات الإرجوت لاستخدامات طبية مختلفة مثل انقباضات الرحم، وارتفاع ضغط الدم، الاضطرابات ذات الصلة بالسيروتونين، والصداع النصفي، وغيرها. كانت هذه القلويدات النباتية تنتج عادةً عن طريق الاستخلاص من الكتلة الصلبة من خيوط الأنواع المتطفلة لجنس الفطر كلافيسيبس. وفي وقتٍ لاحق، أصبحت هذه القلويدات منتجات فطرية للتخميرات التجارية بطريقة الزراعة المغمورة [١٨٤].

(١,٨,٥) المركبات الزراعية Agricultural Compounds

دفعت الجهود الجديدة في علم الصيدلة أيضاً أرباح الأسهم في الزراعة. وشملت المنتجات الجديدة مبيدات الأعشاب الحيوية، العوامل المضادة للطفيليات، ومبيدات الحشرات الحيوية، والعوامل المضادة للفطريات الزراعية، محفزات نمو النبات، والعوامل الإستروجينية الحيوانية.

وقد أثار الاستخدام الزراعي للمواد الكيميائية كمبيدات للأعشاب قلق الكثير من خبراء البيئة، حيث سجل أن الكثير من مبيدات الأعشاب الواسعة الاستخدام تسبب السرطان في الاختبارات الحيوانية طويلة المدى.

ولملء الفراغ، تم استخدام المضادات الحيوية كمبيدات للأعشاب الزراعية. ومنها البيالافوس (ن-{٤[هيدروكسي[ميثيل]فوسفينويل] هوموألانيل} ألانيل ألانين)، والذي كان نشطاً ضد أوراق الحشائش العريضة، وتم تطويره في اليابان عام ١٩٧٣م [١٨٥]. وقبل هذا بعام، تم اكتشاف هذا المنتج من إستربتوميسس فيريدوكروموجينز من قبل مجموعة زاهنر في ألمانيا، كمضاد حيوي واسع المدى فعال ضد البكتيريا وفطر البوتريتيس سينيرا [١٨٦]. وكان ناتج تحلله المائي، حمض دل-هوموألانين-٤-يل(ميثيل) فوسفينيك (دل-فوسفينوثريسين) مثبطاً لإنزيم الجلوتامين سينثيتيز، والمصنع بواسطة شركة هويكست كجلوفوسينات (باستا). وكانت سهولة تحليل البيالافوس في البيئة ذات أهمية كبيرة لخبراء البيئة، حيث إن فترة عمر-النصف له ساعتين فقط.

وتنتج الجيبريلينات، محفزات لنمو النبات، تجارياً بفطر الجيبيريلا فوجيكوروي، والطور الجرثومي لفطر الفيوزاريوم مولينيفورمي، وتستخدم كمنظمات نباتية وفي تخمير الشعير في عملية تخمير البيرة [١٨٧]. وهي تزيد عائد الخضروات وتسرع تطور النباتات ثنائية الحول.

وتعدُّ الكوكسيديا من الأمراض الاقتصادية الكبرى في الدواجن، وتسببها أنواع من البروتوزوا الطفيلية إيميريا. لسنواتٍ، كان هذا المرض يعالج فقط بالمواد الكيميائية المخلقة وبالفعل تم فحص المركبات المخلقة فقط للنشاط المضاد للكوكسيديا. وعلى الرغم من أنها كانت فعالة بشكل عام، إلا أن مقاومة الكوكسيديا قد تطورت، وتم السعي نحو تعديلات كيميائية جديدة لمضادات الكوكسيديا الموجودة. ومن المستغرب، أن مضاداً حيوياً سامة ومحدود المدى يؤخذ عن طريق الحقن، وهو المونينزين، كان له قوة هائلة ضد الكوكسيديا [١٨٨]. وقد سيطرت المضادات الحيوية عديدة الإيثير، وخصوصاً المونينزين (المنتج بواسطة إستربتوميسيس سينامونينزيس)، واللاسالوسيد (بواسطة إستربتوميسيس لاسالينزيس)، والسالينوميسين (المنتج بواسطة إستربتوميسيس ألباس)، على المجال التجاري لمضادات الكوكسيديا منذ ذلك الحين.

ويعدُّ اكتشاف الاستخدام الإضافي للمونينزين كمحفز للنمو في الحيوانات المجترة إضافة مثيرة للاهتمام. لسنوات، تم فحص المواد الكيميائية المخلقة للنشاط في وجبات الأبقار والأغنام للقضاء على الإنتاج الزائد للميثان ولزيادة تكوين الأحماض الدهنية الطيارة (خاصة البروبيونات) في الكرش، والتي من شأنها تحسين كفاءة استخدام الأعلاف. وعلى الرغم من أن المبدأ كان رناناً، فلم تظهر أي منتجات مفيدة. وأظهرت التجارب مع المونينزين أن المركبات عديدة الإيثير كان لها هذا النشاط وهي تستخدم الآن على نطاقٍ واسع [١٨٩].

الأفيرميكتين هو عامل آخر مضاد للطفيليات، والذي حل محل المنتجات المخلقة المستخدمة سابقاً مثل طاردات الطفيليات/ الإنديكتوسيدات. وأدى الفحص المباشر لمحاليل التخمير في الفئران ضد الديدان الخيطية إلى اكتشاف النشاط القوي للأفيرميكتينات ضد الطفيليات المسببة للأمراض في الحيوانات. وكان نشاط

الأفيرميكتينات طاردة الديدان أعلى من المركبات المخلقة المطورة سابقاً. وأنتجت مزرعة إستربتوميسس أفيرميتيليس، والتي عزلت من قبل يوكو تاكاهاشي وساتوشي أومورا وزملائهم في معهد كيتاساتو في اليابان (الموصوفة في [١٩٠])، عائلة من نواتج الأيض الثانوية لها نشاط طارد للديدان ومضاد للحشرات، والتي تم تسميتها "بالأفيرميكتينات"، وتم تطويرها بواسطة شركة ميرك في الولايات المتحدة [١٩١]. وهي مشتقات ثنائية السكر من اللاكتونات كبيرة الحلقات ذات نشاط إستثنائي ضد الطفيليات، على الأقل ١٠ مرات أعلى من أي عامل مخلق معروف طارد الديدان. وعلى الرغم من بنيتها الماكروليدية (كبيرة الحلقات)، فليس للأفيرميكتينات نشاط مضاد ضد البكتيريا والفطريات، ولا تمنع تخليق البروتين، وليست أيونوفورات، وبدلاً من ذلك فهي تتداخل مع النقل العصبي في الكثير من اللافقاريات. وكان نشاط الأفيرميكتينات ضد كلٍ من الديدان الخيطية والطفيليات المفصلية في الأغنام، والأبقار، والكلاب، والخيول ١٠٠٠ مرة أعلى من نشاط المركبات المخلقة المستخدمة سابقاً، الثيوبنزول. وقد تم تأسيس مشتق شبه مخلق، إيفيرميكتين، كمنتج بيطري تجاري.

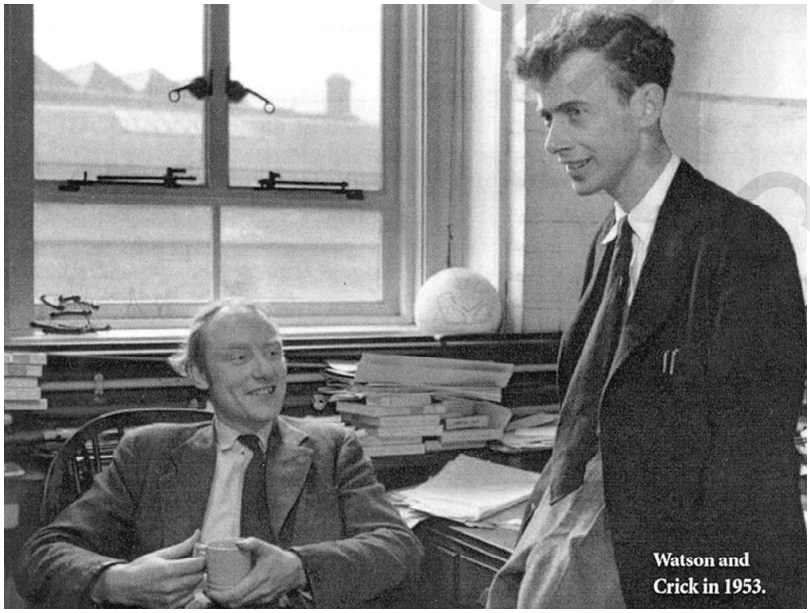
وكان من تداعيات الحظ من العمل مع الأفيرميكتين أن تم اكتشاف نشاط الإيفيرميكتين ضد الذبابة السوداء ناقلة مرض "العمى النهري الإنساني" [١٩٢]. فهو يتداخل مع انتقال ديدان الفيلاريا الخيطية، أونكوسيرا فولفولوس، إلى التجمعات البشرية. وحيث إن ٤٠ مليون شخص أصيبوا بهذا المرض، فقد استقبل قرار شركة ميرك في الثمانينيات بتوريد الإيفيرميكتين مجاناً لمنظمة الصحة العالمية لاستخدامها في معالجة البشر في المناطق الاستوائية بحماسٍ كبير مع الأمل لقهر هذا المرض الطفيلي. والإيفيرميكتين فعال أيضاً في داء الطفيليات الأسطوانية الذي يصيب البشر في آسيا.

واكتشفت عائلة من المبيدات الحيوية للحشرات تدعى سبينوسينس في شركة إيلي ليللي وتم تسويقها من قبل شركة داو للعلوم الزراعية [١٩٣]. وكانت ماكروليدات رباعية الحلقة غير سامة، غير مضادة للبكتيريا، صديقة للبيئة، والتي تنتجها سكاروبولي سبورا سبينوزا، ذات نشاط ضد الحشرات من أوامر مغمدات الأجنحة، ذوات الجناحين، غشائية الأجنحة، متساوية الأجنحة، قشرية الأجنحة، عديمة الأجنحة، ومهدبة الأجنحة.

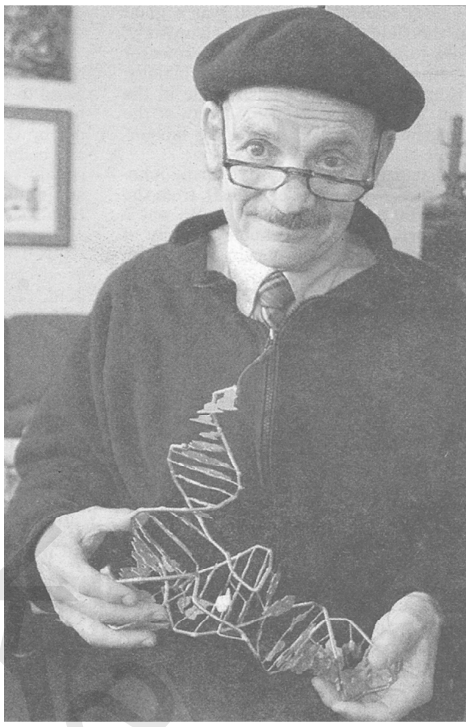
وكان مبيد حشري حيوي آخر مهم هو جزيء كبير غير مضاد للبكتيريا، البروتين المتبلور لبكتيريا باسيلوس ثورينجينسيس. وقد درست السمية الانتقائية لهذا البروتين (دلتا-إندوتوكسين، سم BT) ضد الحشرات قشرية الأجنحة بنجاح في الزراعة، وتعني الانتقائية العالية لسميته تجاه هذا الحشرات أنه لا يضر بالبيئة، وقد تطورت مقاومة قليلة له على مر السنين. وتشمل المنتجات الزراعية التجارية الأخرى النيكوميسين، مجموعة مضادات الفطريات الزراعية المعروفة باسم البولي أوكسينات، والعامل الإستروجيني الحيواني الزياريلانون.

(١ , ٩) الثورة الصيدلانية الحيوية The Biopharmaceutical Revolution

تعدُّ النتائج التي توصل إليها جريجور مندل في منتصف القرن التاسع عشر في وراثة صفات البازلاء من المعالم الرئيسة في علم الوراثة. في عام ١٩٤٤م، اكتشف أفيري، ماككلاود، ومكارتي في معهد روكفلر أن الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي (DNA) هو المادة الوراثية، وكان هذا اكتشافاً كبيراً. بعد ذلك بعامين، اكتشف ليدربيرج وتاتوم الجنس في البكتيريا. واندلعت الثورة في مجال التقنية الحيوية من خلال اكتشاف ١٩٥٣م عن التركيب ثنائي الخيط للحمض النووي من جانب واطسون وكريك (الشكل رقم ١١ , ١). ويعدُّ استخدام الكائنات الحية الدقيقة ومضاداتها الحيوية كأدوات للبحوث الأساسية هو المسؤول الأساسي عن التقدم الملحوظ في مجال البيولوجيا الجزيئية وعلم الوراثة الجزيئية. ولم تأت ثورة التقنية الحيوية فوراً، ولكنتها تطلبت نحو ١٥ عاماً لكي تتم الاكتشافات الأساسية الإضافية من قبل الآخرين في مجال البيولوجيا الجزيئية/ علم الوراثة. ففي عام ١٩٥٦م، سجل ألكسندر ريتش (الشكل رقم ١٢ , ١) وديفيد ديفيس أن جزيئين إثنين من الحمض النووي الريبوزي (RNA) أحادي الخيط يمكن لهما أن ينتظما بشكل مفاجئ لتشكيل اللولب المزدوج. وعلى الرغم من أنه قد تم التشكيك في هذا من قبل آخرين، فقد أدى اللولب المزدوج من الـ RNA، بعد ٤٠ عاماً، إلى اكتشاف الأحماض النووية الريبوزية الدقيقة وتداخل الحمض النووي الريبوزي. وتلقى بيدل وتاتوم جائزة نوبل في عام ١٩٥٨م لتوضيح العلاقة بين الجينات والإنزيمات. بعد ثلاث سنوات، اكتشف مونود وجاكوب تنظيم التعبير الجيني، وفي ١٩٦٢م، وصف سميث وأربور الإنزيمات الداخلية المحللة للنيوكلوتيدات (إندونيكليزيس).



الشكل رقم (١١ , ١). جيمس واطسون وفرانسيس كريج.

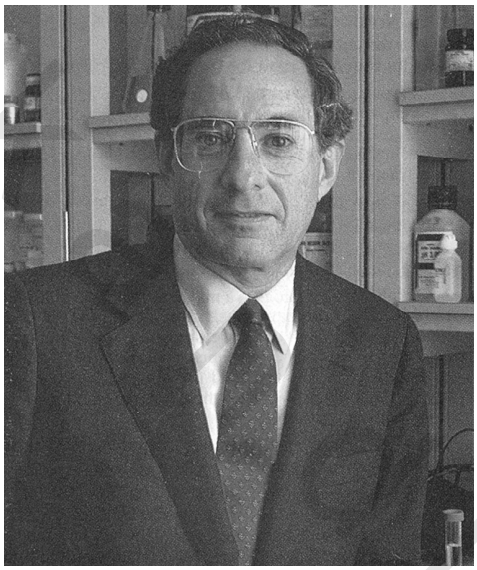


الشكل رقم (١٢, ١). ألكسندر ريتش.

وكان العام ١٩٦٦م مهماً جداً، حيث تم خلاله فك رموز الشفرة الوراثية بواسطة نيرينبيرج، وماتهاي، وليدر، وكورانا، وأوتشوا. وعزل شابيرو وبيكويز جين في عام ١٩٦٩م، وخلق كورانا كيميائياً جيناً في عام ١٩٧٠م. حتى هذه النقطة، تم الاعتراف بأن التعديل الجيني يحدث فقط بين الكائنات الحية من نفس النوع أو الأنواع ذات الصلة الوثيقة. حتى في المختبرات، كان إدماج البروتوبلاست مقتصراً على الأنواع ذات الصلة وراثياً. جميع الكائنات لها إنزيمات إندونيكليزات تتعرف على الحمض النووي الخارجي وتدمره، وبالتالي لن يحدث "تعديل غير شرعي".

ثم في ١٩٧٢-١٩٧٣م، دشن تطوير الحمض النووي الريبوزي المعدل بواسطة بيرغ، وكوهين، وبوير في جامعة ستانفورد وجامعة كاليفورنيا، بسان فرانسيسكو، ولادة التقنية الحيوية الحديثة [١٩٤]. واكتشف هؤلاء الباحثون كيفية استخدام إنزيمات التقييد لقطع جزيئات الحمض النووي، وكيفية استخدام إنزيم آخر وهو الإنزيم اللاحم للحمض النووي، لإضافة جزيئات الحمض النووي من الكائنات الحية المختلفة، وكيفية إدخال الحمض النووي الريبوزي المعدل عبر وسيلة ما (مثل البلازميد، والفيروس البكتيري: الفاج) في بكتيريا الإيشيريشيا كولاي. وحددوا هكذا طبيعة إجراء التعديل الوراثي عبر حواجز الأنواع المختلفة. ودفع هذا التقنية الحيوية إلى آفاقٍ جديدة وأدى إلى إنشاء صناعة صيدلانية حيوية جديدة في الولايات المتحدة وحول العالم.

ولم يحدث استغلال للاكتشافات الثورية البيولوجية الأساسية، والتي بدأت في عام ١٩٧١م، من فراغ، وإنما اعتمد اعتماداً كبيراً على البنية الصلبة لصناعة التخمير. في ذلك الوقت، تنبأ طبيب (بيتر فارلي)، وكيميائي حيوي (رونالد كاب، الشكل رقم ١٣ ,١)، والفيزيائي الحائز على جائزة نوبل (دونالد جلاسر)، مع عدة أشخاص آخرين، بتسويق تقنية الحمض النووي الريبوزي المعدل تجارياً، وأنشئوا شركة سيتاس في بيركلي، كاليفورنيا، في عام ١٩٧١م. وهكذا بدأت واحدة من المغامرات الأكثر إثارة في تاريخ التقنية الحيوية الصناعية. وقادت هذه الرؤية من قبل مؤسسي سيتاس إلى إنشاء صناعة تقنية حيوية رئيسة، لخدمة احتياجات المرضى في جميع أنحاء العالم، وإحداث ثورة في علم الميكروبيولوجيا الصناعية.



الشكل رقم (١٣ ,١). رونالد كاب.

تم تأسيس ثاني شركة للتقنية الحيوية في عام ١٩٧٦م، عبر الخليج من سيتاس في جنوب سان فرانسيسكو، عن طريق هربرت بوير، وروبرت وسوانسون. في ذلك العام نفسه، تم تعبير جين بشري في البكتيريا، وتم تكرار وتعبير الحمض النووي للخميرة. بحلول عام ١٩٧٨م، طورت شركة جينينتيك الأنسولين البشري ومنشط بلازمينوجين الأنسجة (tPA). أيضاً في عام ١٩٧٨م، تم إدخال الحمض النووي البكتيري بنجاح في كروموسومات الخميرة وتم تأسيس شركة بيوجين في كامبريدج، ماساشوستس. وفي عام ١٩٧٩م، تم تحويل برتوبلاست الخميرة بواسطة هجين بلازميدي من إيشيريشيا القولون/ الخميرة. وتأسست شركة أمجين في جنوب كاليفورنيا عام ١٩٨٠م، وهو العام نفسه الذي وضعت فيه المحكمة العليا الأميركية قاعدة بارزة، مفيدة أن الكائنات الحية يمكن تسجيلها كبراءة اختراع. ويستند ذلك على عمل أنانداً شاكرابارتي.

في عام ١٩٨١م، تم تأسيس معهد علم الوراثة، وشركتي تشيرون وجنزايم، ووافقت هيئة الغذاء والدواء على أول عدة تشخيصية للتعديل الوراثي. وفي عام ١٩٨٢م، أصبح الأنسولين البشري المعدل جاهزاً للتسويق كمسعى من جينينتيك/ إيلي ليللي. وسرعان ما تبعه منتجات أخرى: هرمون النمو البشري في عام ١٩٨٣م؛ ألفا-انترفيرون، ولقاح التهاب الكبد بي المعدل في عام ١٩٨٦م؛ منشط بلازمينوجين الأنسجة (tPA) في عام ١٩٨٧م؛ إرثروبويتين (EPO) في عام ١٩٨٩م؛ العامل المحفز للمستعمرة المحببة (G-CSF) في عام ١٩٩١م؛ عامل ثمانية (Factor VIII) في ١٩٩٢م؛ وبيتا-انترفيرون في عام ١٩٩٣م.

وعلى الرغم من أن سيتاس لم تعد موجودة كشركة مستقلة الكيان، بعد أن تم دمجها في شركة تشيرون في عام ١٩٩١م، إلا أنه ينبغي تذكرها لوقتٍ طويل كمؤسس للتقنية الحيوية الحديثة والمطور لتفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في عام ١٩٨٥م، وهي تقنية ذات أهمية هائلة اليوم. وفي الواقع، حصل الباحث الرئيس لتقنية الـ PCR، كاري موليس، على جائزة نوبل الوحيدة (منح في عام ١٩٩٣م) التي أعطيت لعالم لعمله في صناعة التقنية الحيوية.

منذ ذلك الحين، تم تأسيس الآلاف من الشركات، بما في ذلك إيمونيكس، وسينتوكور، وميدإيميون، ...إلخ. واستثمر كثير منها في مجال التقنية الحيوية الحديثة مع عدم وجود فكرة واضحة عن المستقبل ولكن مع الإيمان بأن علم الوراثة من شأنه أن يؤدي إلى منتجات لا يمكن حتى تصورها في ذلك الوقت؛ وبالفعل تحقق هذا الحلم بشكلٍ كبير. وأدى هذا إلى انفجار في نشاط الاستثمار في الشركات الجديدة المخصصة أساساً للابتكار من خلال النهج الوراثية. ودخلت شركات أحدث المشهد من مفاهيم مختلفة مثل الهندسة الميكروبيولوجية والمعاملة النهائية.

بحلول عام ١٩٨٨م، كان هناك حوالي ٤٤٠ شركة للتقنية الحيوية و٧٠ شركة كبيرة دوائية، وكيميائية، وشركات للطاقة في الولايات المتحدة، تكرس كل أو جزء من مواردها للتقنية الحيوية. في عام ١٩٩٣م، خدم الميدان المجالات التالية: ٤١٪ الأدوية، والتشخيص ٢٧٪، والمستلزمات ١٥٪، والزراعة ٩٪، والمجالات الكيميائية والبيئية والخدمات بنسبة ٨٪. وارتفع عدد الشركات الأميركية إلى نحو ١٥٠٠ بحلول عام ٢٠٠٣م. وكان عدد موظفي الولايات المتحدة ١٩١٠٠٠ في عام ٢٠٠٢م. ووصل الإنفاق على مجال البحث والتطوير في التقنية الحيوية في الولايات المتحدة عام ٢٠٠٠م إلى ٢١ مليار دولار وكانت الإيرادات ٣٦ مليار دولار.

وتم تأسيس عدد كبير من شركات وأقسام التقنية الحيوية في الشركات الكبرى في أوروبا وآسيا. وبلغ السوق العالمي لمنتجات الحمض النووي المعدل في ٢٠٠٥م حوالي ٤٣ مليار دولار. واليوم، تمتلك الشركات الصيدلانية الكبيرة أجزاءً كبيرة في بعض هذه الشركات، وبلغت العائدات الصيدلانية أكثر من ٦٠ مليار دولار أمريكي.

وتعامل السوق الصيدلاني للحمض النووي المعدل مع أربعة مجالات رئيسة هي: (١) منتجات الدم (محللات الجلطات، إنزيمات الديسميوتيز، أدوية الصدمة الإنتانية، عوامل تخثر الدم، الإرثروبويتين)؛ (٢) منتجات العلاج المناعي (ألفا-، بيتا-، جاما-إنترفيرون، الإنترلوكينات، العوامل المحفزة للمستعمرة)؛ (٣) مقاتلي الأمراض المعدية (لقاح التهاب الكبد بي، لقاح الإيدز)؛ (٤) عوامل النمو للخلايا الثديية (عامل نمو الخلايا الجلدية، عوامل النمو شبيهة الإنسولين، وعوامل نمو الخلايا الليفية، وعوامل النمو المحولة، وعامل النمو المستمد من الصفائح الدموية، عامل إفراز هرمون النمو، مستحلبات الرئة، وعامل الموت الموضعي للورم).

وحققت التقنية الحيوية الكثير من الفوائد للمجتمع [١٩٥]. (١) لم يعد على مرضى السكر أن يخشوا من إنتاج أجسام مضادة للأنسولين الحيواني. (٢) لا يعاني الأطفال المفتقرين إلى هرمون النمو من التقزم أو الخوف من خطر الإصابة بمتلازمة كروتزفيلد-جاكوب. (٣) أصبح الأطفال الذين لديهم مرض الورم الحبيبي المزمن قادرين على التمتع بحياة طبيعية عن طريق أخذ جاما-انترفيرون كعلاج. (٤) يتعافى المرضى الذين يخضعون للعلاج الكيميائي لمرض السرطان أو العلاج الإشعاعي بسرعة أكبر مع عدد أقل من حالات العدوى عند استخدامهم العامل المحفز للمستعمرة المحببة (G-CSF).

ويمكن ملاحظة نجاح الثورة الصيدلانية البيولوجية في البيانات التالية. بين عامي ١٩٩٧- ٢٠٠٢م، جاء ٤٠٪ من الأدوية التي أدخلت في الممارسة الطبية من شركات التقنية الحيوية. رخصت أكبر خمس شركات للأدوية من ٦ إلى ١٠ منتجات من التقنية الحيوية أو الشركات الصيدلانية المتخصصة، مما أعطي ٢٨-٨٠٪ من عائداتها. تم إجازة إثنين من الأدوية/ اللقاحات لصناعة التقنية الحيوية في عام ١٩٨٢م، لا شيء في ١٩٨٣/ ١٩٨٤م، واحد في عام ١٩٨٥م، و٣٢ في عام ٢٠٠٠م! وارتفع عدد براءات الاختراع الممنوحة لشركات التقنية الحيوية من ١٥٠٠ في عام ١٩٨٥م إلى ٩٠٠٠ عام ١٩٩٩م. وفيما يلي نناقش أهم منتجات الصناعة الصيدلانية البيولوجية.

(١,٩,١) الإنسولين البشري (نوفولين، هومولين) Human Insulin (Novolin, Humulin)

سوف يتم دائماً تذكر الأنسولين البشري على أنه المنتج الذي دشن الصناعة الصيدلانية البيولوجية. وتم تطوير الأنسولين البشري، أول بروتين معدل أنتج ووافقت عليها هيئة الغذاء والدواء، بواسطة شركة جينينتيك في عام ١٩٧٩م وتم إنتاجه صناعياً في عام ١٩٨٢م من قبل شركة ايلي ليللي. وتطلبت العملية سابقاً الاستخلاص من بنكرياس الماشية والخنازير الميتة، ولم يكن المنتج مطابقاً للأنسولين البشري. وعلاوةً على ذلك، تحتوي المنتجات الحيوانية على شوائب تسبب الحساسية. وتم حل كل هذه المشكلات بالأنسولين البشري المعدل.

(١,٩,٢) الإرثروبوتين (إيبوجين، بروكريت) Erythropoietin (Epogen, Procrit)

الإرثروبويتين (EPO) هو عامل نخاع العظم يستخدم لعلاج إختلال الكلى الوظيفي وعلاج الفشل الكلوي المزمن في مرضى العلاج الكيميائي الذين يستخدمون غسيل الكلى. وهو يعمل على تحسين أنواع معينة من فقر الدم من خلال تحفيز إنتاج وتمايز خلايا الدم الحمراء. ودخل المنتج مرحلة التجارب السريرية في عام ١٩٨٥م وتمت الموافقة عليه في عام ١٩٨٩م. كما أنه أيضاً مفيد لفقر الدم الناجم عن العلاج بالأزيدوثيميدين للإيدز، والعلاج الكيميائي للسرطان. كما يعطى أيضاً للمرضى الذين يريدون استخدام دمائهم الخاصة بدلاً من دماء الآخرين.

(١,٩,٣) الإنترفيرونات Interferons

تم التصريح باستخدام ألفا-إنترفيرون (إنترون-أ، ريفيرون) من قبل هيئة الغذاء والدواء ضد ورم كابوزي الخبيث، وسرطان الدم النخاعي المزمن، والثآليل التناسلية، وسرطان الدم شعري الخلية. وأصبح مفيداً في العلاج المضاد للفيروسات. بحلول عام ١٩٩٢م، تمت الموافقة على استخدامه لعلاج التهاب الكبد بي و سي. وتم التصريح باستخدام بيتا-إنترفيرون ("بيتاسيرون"، إنترفيرونبيتا-١أ المعدل، أفونيكس) من قبل هيئة الغذاء والدواء لعلاج مرض التصلب المتعدد في عام ١٩٩٣م وجاما-انترفيرون في عام ١٩٩٠م لعلاج مرض الورم الحبيبي المزمن.

(١,٩,٤) هرمون النمو البشري (سوماتوتروبين، سوماتروبين؛ هوماتروبين، نوتروبين، بروتروبين، سوماترين، سيروستيم)

Human Growth Hormone (Somatotropin, Somatropin; Humatrope, Nutropin, Protropin, Somatren, Serostim)

كان إنتاج هرمون النمو البشري (hGH)، والذي تم تطبيقه فورياً في علاج الأطفال صغار الحجم غير الطبيعين، محاولةً مبكرةً لمنظمة جينيتيك. حتى عام ١٩٨٤م، تم إنتاج هرمون النمو البشري من الغدد النخامية للجثث البشرية. وكان هذا مكلفاً جداً، وفي بعض الحالات، تلوثت المادة بفيروس كروتزفيلد-جاكوب، مما أدى إلى الوفاة. ومنذ ذلك الحين، تم استبدال المادة النخامية بهرمون النمو البشري المعدل، مما قضى على هذه المشكلة. وعلى الرغم من أن هرمون النمو البشري تمت إجازته أصلاً لعلاج قصر القامة فقط، إلا أنه تمت إجازته لاحقاً لعلاج أحد عشر مرضاً؛ ويباع الكثير منه للحروق وكمنتج مضاد للشيخوخة.

(١,٩,٥) منشط بلازمينوجين الأنسجة (أكتيفيز، ألتيبليز)

Tissue Plasminogen Activator (Activase, Alteplase)

يذيب منشط بلازمينوجين الأنسجة (tPA) جلطات الدم في الشرايين التاجية البشرية، ويوصف للوقف السريع للنوبات القلبية (احتشاء عضلة القلب الحاد)، وجلطة الأوردة العميقة، والجلطة الرئوية، والسكتة

الدماغية. وتم إدخاله إلى السوق في أواخر عام ١٩٨٧م. وتم توسيع استخدامه لمرضى السكتة الدماغية في عام ١٩٩٦م.

(٦, ٩, ١) الإنترلوكينات Interleukins

أظهر الإنترلوكين-٢ (برولوكين، IL-2) نشاطاً ضد سرطان خلايا الكلى، وتمت الموافقة عليه في ١٩٩٢م. وفي أوائل عام ١٩٩٨م وافقت هيئة الغذاء والدواء على إنترلوكين ١١ المعدل، نوميجا (IL-11, Neumega) لعلاج الثرومبوسيتوبينيا المرتبط بالعلاج الكيماوي للسرطان (أي انخفاض عدد الصفائح الدموية)، وذلك بسبب قدرته على تحفيز تكوين الصفائح الدموية.

(٧, ٩, ١) العامل ثمانية Factor VIII

يتلقى مرضى سيلان الدم تقليدياً منتجات تخثر الدم المشتقة من البلازما البشرية لتصحيح نقص الدم لديهم من عامل تخثر الدم، بروتين العامل ثمانية. وللأسف فقد أصبح ٦٠٪ من هؤلاء المرضى مصابين بفيروس نقص المناعة، أو التهاب الكبد أو الأمراض الأخرى التي تلوث فيروساتها هذه المنتجات. بدأت التجارب السريرية في عام ١٩٨٩م على العامل ثمانية المعدل لاستخدامه في سيلان الدم. وافقت هيئة الغذاء والدواء على المنتج في عام ١٩٩٣م.

(٨, ٩, ١) العوامل المحفزة للمستعمرة Colony-Stimulating Factors

إن العوامل المحفزة للمستعمرة هي عوامل نخاع العظم التي تستخدم لعلاج إختلال الكلى الوظيفي ومرضى العلاج الكيميائي. وتمت الموافقة على العامل المحفز للمستعمرة المحببة (G-CSF؛ نويبوجين، فيلجراستين، لوكين) في عام ١٩٩١م لعلاج نقص خلايا الدم البيضاء الناتج من العلاج الكيميائي (نويتروبينيا). كما تمت الموافقة عام ١٩٩١م أيضاً على العامل المحفز للمستعمرة المحببة الماكروفاجي (GM-CSF) لتحفيز نمو خلايا الدم البيضاء في زراعات نقل نخاع العظم الذاتية.

(٩, ٩, ١) إنزيم الدناز البشري (بالموزايم) Human DNase (Pulmozyme)

وافقت هيئة الغذاء والدواء عام ١٩٩٤م على الدناز البشري للتليف الكيسي (CF). وكان أول دواء جديد في ٣٠ عاماً لعلاج التليف الكيسي، وهو المرض الذي يصيب ٣٠٠٠٠ شخص في الولايات المتحدة. وفي التجارب السريرية أظهر الدناز أيضاً فعالية في الالتهاب الشعبي المزمن، وهو المرض الذي يصيب ٢ مليون شخص في الولايات المتحدة.

(١٠ ,٩ ,١) إنزيم الجلوكوسيريبروسيديز (سيريزيم) Glucocerebrosidase (Cerezyme)

تـمت الموافقة علـى الجلوكوسيريبروسيديز في عام ١٩٩٤م لمرض غوشيه الوراثي (Gaucher's disease). ولا يستطيع المرضى الذين يفتقرون إلى هذا الإنزيم منع تراكم الدهون في الأجهزة الحيوية والعظام.

(١١ ,٩ ,١) الأجسام المضادة أحادية النسيلة Monoclonal Antibodies

تم اكتشاف الأجسام المضادة أحادية النسيلة (mAbs) من قبل جورج كولتر وميلشتاين سيزار في المملكة المتحدة في عام ١٩٧٥م [١٩٦]، حيث دمجوا خلية سرطان جلد للفأر ("المايلوما") مع خلية دم بيضاء منتجة للأجسام المضادة. كانت النتيجة خلية هجينة ("الهايبريدوما، ورم هجين") والتي أنتجت أجسام مضادة متخصصة نقية. ومنح عالما المناعة جائزة نوبل في عام ١٩٨٤م. سابقاً، استخدمت الأجسام المضادة متعددة النسائل (pAbs)، ولكنها كانت تحتوي على تخصصيات وإنجذابيات متباينة وكانت متغيرة جداً. وكانت تنتج من قبل النظام المناعي الكلي للحيوان، في حين أن الأجسام المضادة أحادية النسيلة تنتج من قبل خلايا مفردة من الجهاز المناعي.

ولإنتاج الأجسام المضادة أحادية النسيلة، تم تلقيح الفئران بمولد أجسام مضادة مفرد، مما يسمح بإظهار رد فعل مناعي، ويتم إزالة طحال الفئران، واستخلاص الخلايا، ودمجها مع خلايا من الخط الخلوي لسرطان الغدد الليمفاوية (خلايا سرطانية خالدة). ثم يتم استنساخ خلايا "الهايبريدوما" المدمجة وتفرز لعزل هذه خلايا الهايربريدوما التي تفرز الجسم المضاد المحدد المطلوب. وحيث إن جسم الإنسان يمكن أن يتفاعل بطريقة غير مرغوبة لتسلسلات الفأر الجينية، فقد تمت "أنسنة" الأجسام المضادة أحادية النسيلة بواسطة تقنيات الهندسة الوراثية. وكانت الفئران معدلة وراثياً بحيث إن الجينات البشرية المشفرة للسلاسل البشرية الثقيلة وسلسلة كابا البشرية الخفيفة استبدلت جينات الفأر ذات الصلة، والتي تم نبذها. ويمكن تكوين أحاديات النسيلة أيضاً في الخلايا المناعية البشرية. وكانت تستخدم لربط أو منع ارتباط البروتين المستهدف كـ"رصاصة سحرية"، والتي يتم فيها جلب الدواء أو النظير المشع إلى هدف معين.

بعد عام ٢٠٠٠م، أصبحت mAbS فئة البروتينات العلاجية الأسرع نمواً، ووصلت إلى سوق من ٦,٨ مليار دولار في عام ٢٠٠٦م. وكان الريوبرو (ReoPro) أول جسم مضاد أحادي النسيلة علاجي ناجح، حيث تم التصريح به عام ١٩٩٤م لمنع تجمع الصفائح الدموية (تخثر الدم). ومنع بنجاح مضاعفات القسطرة مثل الموت، والنوبة القلبية، والحاجة إلـى تكرار القسطرة. وتبع ذلك أربعـة أجسام مضادة أحادية النسيلة في عام ١٩٩٨م: (١) إنفليكسيماب (ريميكيد) المثبط لعامل الموت الموضعي للورم (TNF) والذي صرح به لعلاج مرض كرون (Crohn's disease) وأيضاً لالتهاب المفاصل الروماتويدي؛ (٢) بازيليكسيماب (سيموليكت) الـمستخدم مع

السيكلوسبورين والكورتيكوستيرويدات للوقاية من رفض الأعضاء الحاد في مرضى زراعة الكلى؛ (٣) تراستوزوماب (هيرسيبتين) استهدف الجين الورمي لبروتين مستقبلات عامل النمو HER2 الجلدي، واستخدم لعلاج سرطان الثدي المتأخر في ٢٥-٣٠٪ من النساء المصابات بهذا المرض واللاتي تعبر أورامها الـ HER2 بإفراط؛ (٤) باليفيزوماب (سيناجيس، MEDI-493) للوقاية من أمراض الجهاز التنفسي السفلي نتيجة فيروس المخلوي التنفسي. وكان هذا أول جسم مضاد أحادي النسيلة ضد الأمراض المعدية، واستخدم لوقف الفيروس المخلوي التنفسي (RSV) الذي يؤدي إلى أمراض خطيرة بالجهاز التنفسي السفلي في الأطفال المرضى. وقد تم التصريح باستخدام أداليموماب (هوميرا) في عام ٢٠٠٣م لالتهاب المفاصل الروماتويدي. واستخدم أحادي نسيلة آخر مهم جداً، وهو الريتوكسيماب (الريتوكسان)، في علاج الأورام اللمفاوية الغير-هودجكينية.

(١٢, ٩, ١) مستحضرات صيدلانية بيولوجية إضافية Additional Biopharmaceuticals

تشمل المنتجات المهمة الأخرى: (١) الإيتانرسيبت (إينبريل)، المصرح به في عام ١٩٩٨م لالتهاب المفاصل الروماتويدي عبر ارتباطه وتثبيطه للـ TNF، وهو بروتين يشارك في الالتهاب؛ و(٢) الإيماتينيب (جيليفيك، جليفيك)، وهو فعال ضد سرطان الدم النقوي المزمن (CML). وهو مرض يسببه تغيير وراثي في المكان بين الصبغيات ٩ و٢٢، مولداً بروتيناً غير طبيعياً، Brc-Ab1، والذي يسبب تكاثر غير منتظم لخلايا الدم البيضاء مما يؤدي إلى سرطان الدم. ويمنع الإيماتينيب عملBrc-Ab1 وهو أيضاً فعال ضد الأورام اللحمية المعدية المعوية (GIST).

(١٠, ١) العوائل المعدلة وراثياً Recombinant Hosts

وصلت تخميرات الكائنات الدقيقة عالية الكثافة من الخلايا إلى مستويات من ٢٣٣ جرام وزن خلية جاف/لتر بالنسبة للبكتيريا و٢٦٨ جرام وزن خلية جاف/لتر بالنسبة للخمائر [١٩٧]. ويتم إنتاج البروتينات الكثيرة الثديية في هذه الميكروبات بمستويات تصل إلى ٧٠٪ من بروتين الخلية وتركيزات مرتفعة تصل إلى ١٥ جم/لتر.

(١, ١٠, ١) إيشيريشيا القولون (إيشيريشيا كولاي) *E. coli*

كانت إيشيريشيا القولون (إيشيريشيا كولاي) أول نظام بكتيري أكثر شعبية لإنتاج البروتينات المعدلة. في وقت مبكر من حقبة المستحضرات الصيدلانية البيولوجية تبين أن نفس كميات الملليجرامات من البروتينيات الثديية التي يجري إنتاجها في بضعة لترات من محاليل إيشيريشيا القولون المعدلة كان لابد سابقاً أن تستخرج من أنسجة المخ لنصف مليون خروف. وشملت فوائد إيشيريشيا القولون كعائل معدل بالإضافة إلى الكثافة العالية

لنمو الخلايا والإنتاجية المرتفعة ما يلي: (١) كان من السهل تعديل الجينوم بسرعة وبدقة؛ (٢) كان النمو سريعاً؛ (٣) كانت ظروف النمو بسيطة؛ (٤) تم تخفيض نشاط إنزيم البروتييز بسهولة؛ (٥) أمكن تجنب إدراج نظائر الأحماض الأمينية؛ (٦) سهولة التحكم في البادئ؛ (٧) يمكن تغيير عدد نسخ البلازميد بسهولة؛ (٨) لم يكن تغيير تدفق كربون الأيض مشكلة؛ (٩) سهولة تكوين الروابط ثنائية الكبريت داخل الخلايا؛ (١٠) بلغ تراكم البروتينات غير المتماثلة نحو ٥٠٪ من وزن الخلية الجاف؛ (١١) إمكانية البقاء على قيد الحياة في مجالٍ واسع من الظروف البيئية؛ (١٢) لم تكن هناك حاجة لمكونات بيئية مكلفة؛ و(١٣) إمكانية الحصول على نفس النتائج خصوصاً مع التحكم عن طريق الحاسب الآلي [١٩٥].

وكانت إحدى مشكلات إيشيريشيا القولون هي تكوين البروتينات غير المتشابهة في شكل أجسام مشتملة. وبهذه الطريقة، كانت البروتينات المعدلة غير نشطة، ومتجمعة، وغير قابلة للذوبان، وتحتوي عادة على روابط غير أصلية ثنائية الكبريت داخل الجزيئات وبين الجزيئات، وجزيئات سيستايين حرة بصورة غير عادية. ولإنتاج البروتين النشط فإنه يجب إزالة هذه الأجسام من الخلية بعملية التجانس، والغسيل، والطرد المركزي، ثم الإذابة بواسطة مغيرات الطبيعة (مثل حمض الهيدروكلوريك-جوانيدين، اليوريا وسلفات الصوديوم دوديسيل) التي تكشف البروتين، ثم المعاملة بالعوامل المختزلة التي تكسر الروابط ثنائية الكبريت. ثم، إعادة طي البروتين بإزالة مغيرات الطبيعة والعامل المختزل. وعمليات إعادة الطبيعة المستخدمة كانت (١) الأكسدة بالهواء، (٢) نظام إعادة الأكسدة بالجلوتاثيون، و(٣) خليط ثنائي الكبريت من نظامي بروتين-كبريت-سلفونات والبروتين-كبريت-جلوتاثيون. وتم أيضاً إنتاج البروتينات المعدلة في صورة بيولوجية نشطة قابلة للذوبان عند مستويات عالية بإدماج جيناتها إلى جين الثيوريدوكسين في إيشيريشيا القولون. وتم إنتاج بروتينات بشرية كثيرة على مستويات من ٥-٢٠٪ من مجموع البروتينات كمدمجات في سيتوبلازم إيشيريشيا القولون. واحتفظت بعض المدمجات بخصائص الثيوريدوكسين التي منها (١) يتم إفرازه بالصدمة التناضحية أو طرق التجميد/ الذوبان و(٢) الثبات في درجات الحرارية العالية.

وطريقة أخرى للحد من تكوين الأجسام المشتملة المحتوية على البروتينات غير المتشابهة في إيشيريشيا القولون هي خفض درجة حرارة النمو من ٣٧ إلى ٣٠ درجة مئوية. وتشمل المنتجات المصنعة في إيشيريشيا القولون الإنسولين البشري، وهرمون النمو البشري، وألفا-، وبيتا-، وجاما-إنترفيرون، و G-CSF [١٩٥].

وكانت كل البولي ببتيدات التي تفرزها الكائنات حقيقية النواة جليكوزيلاتية. وتعتمد عملية الارتباط بالجليكوزيل على النوع، والنسيج، والخلية. وللأسف، فإن إيشيريشيا القولون لاتقوم بهذه العملية للبروتينات. وفي بعض الحالات، فإن البروتين الجليكوزيلاتي بصورة طبيعية عادة مايكون نشطاً بدون شاردة الكربوهيدرات،

ويمكن تصنيعه في البكتيريا. وقد وجد أن هذ هو الحال مع جاما-انترفيرون. وفي الحالات التي يكون فيها الارتباط بالجليكوزيل ضروري للاستقرار أو الطي السليم للبروتين (مثل، إرثروبويتين)، فإنه يمكن في كثيرٍ من الأحيان تكوين البروتينات بالخميرة المعدلة، والفطريات، والحشرات، أو الخلايا الثديية.

(١,١٠,٢) الخمائر Yeasts

توفر الخمائر مزايا معينة على البكتيريا كعوائل للاستنساخ. (١) يمكنها أن تفرز البروتينات غير المتشابهة إلى المحاليل خارج الخلية عندما يتم إرفاق تسلسلات إشارية سليمة إلى الجينات التركيبية. (٢) يمكنها أن تقوم بربط البروتينات بالجليكوزيل. ومع ذلك، غالباً ما تكون عملية الارتباط بالجليكوزيل بواسطة خميرة سكارروميسس سيرفيسي غير مقبولة للبروتينات الثديية لأن السكريات الأوليجية المرتبطة بالأوكسجين تحتوي فقط على سكر المانوز في أن البروتينات للكائنات حقيقية النواة الأعلى تحتوي على سلاسل مرتبطة بالأوكسجين وتكون سياليلاتية. وعلاوة على ذلك، فإن السكارروميسس سيرفيسي تقوم بعملية الارتباط بالجليكوزيل للمواقع المرتبطة بالنيتروجين والتي أدت إلى انخفاض في كلٍ من النشاط وإرتباط المستقبلات، مما تسبب في مشكلات مناعية.

ووجد أن خميرة البيكيا باستوريس التي تستطيع استخدام مركبات الميثيل (ميثيلوتروفيك) تمتلك مزايا أكثر عن السكارروميسس سيرفيسي كعائل للجينات غير المتشابهة. (١) يمكن لهذه الخميرة أن تنمو بكثافات عالية جداً في البيئات الخالية من البروتين. (٢) لها مستوى أعلى من إنتاجية البروتين. (٣) لا تقوم بعملية الارتباط بالجليكوزيل بإفراط. (٤) تم إدخال جينات خارجية في نسخ متعددة في الكروموسوم. (٥) كانت مستويات إنتاج البروتين من قبل هذه الخمائر مرتفعة نسبياً. على سبيل المثال، يمكن أن تنتج البيكيا باستوريس خارج الخلايا ٤ جم/ لتر من إنترلوكين-٢، ٢ جم/ لتر من ألبومين المصل البشري، و١٠ جم/ لتر من الـ TNF، وهذه المواد تنتج عادة داخل الخلايا. (٦) تم بشكلٍ مستقر إدماج شريط التعبير في جينوم العائل في مواقع محددة. (٧) كانت البيكيا باستوريس نصفية العدد الكروموسومي في النواة وقابلة للتطفير التقليدي.

(١,١٠,٣) الفطريات Molds

عند إدخال جينات خارجية في الفطريات الخيطية عن طريق البلازميدات، فإنها تندمج بشكلٍ مستقر في الكروموسوم كتكرارات ترادفية. ويمكن ملاحظة ما يصل إلى ١٠٠ نسخة من الجينات. ويصل إنتاج الكيموسين البقري المعدل بواسطة أسبرجلس نيجر أواموري إلى ١ جم/ لتر، واللاكتوفيرين البشري بواسطة أسبرجلس أواموري إلى ٢ جم/ لتر من البروتين خارج الخلية.

(١, ١٠, ٤) الخلايا الحشرية Insect Cells

تعدُّ الخلايا الحشرية في الزراعة عائلاً جيداً لإنتاج البروتينات المعدلة [١٩٨]. وتنتج زراعات الخلايا الحشرية المعدلة أكثر من ٢٠٠ من البروتينات المشفرة بواسطة جينات من الفيروسات والبكتيريا والفطريات والنباتات والحيوانات. وقد تم إعداد ناقلات التعبير من الفيروسات العصوية التي تهاجم اللافقاريات وليس الفقاريات أو النباتات، وبالتالي تم تأمين السلامة. والفيروس العصوي الأكثر استخداماً هو فيروس البولي هيدروزيس النووي (أوتوجرافا كاليفورنيكا) الذي يحتوي حمض نووي ريبوزي ثنائي الخيط دائري، وهو بطبيعة الحال معدياً لخلايا الحشرات قشرية الأجنحة، ويمكن بسهولة تنميته في المختبر. ويحتوي الفيروس على جين يشفر بروتين البوليهيدرين والذي يتم إنتاجه عادةً في مستوياتٍ مرتفعة جدا وليس ضرورياً لتكاثر الفيروس. ويتم وضع الجين المراد استنساخه تحت السيطرة القوية لبادئ البوليهيدرين الفيروسي، وتم إنتاج مستويات مناسبة من البروتينات مع الكثير من التعديلات بعد عملية الترجمة للكائنات حقيقية النواة الأرقي، بما في ذلك عملية الفسفرة، والارتباط بالجليكوزيل، وإنقسام الببتيد صحيح الإشارة، وتجهيز البروتين، وعملية الارتباط بالأحماض الدهنية، وعملية الأسيلة.

والعائل المعتاد في زراعة الخلايا المعلقة هو دودة الحشد الخريفية (سبودوبتيرا فراجيبيدا). وبديلاً عن ذلك، يتم استخدام زراعة اليرقات والتي هي أرخص بكثير من زراعة الخلايا. وقد أنتجت أنظمة اليرقات ٦٠٠ ملجم/ لتر من البروتين المعدل.

(١, ١٠, ٥) الخلايا الثديية Mammalian Cells

تم البدء باستخدام زراعة الخلايا الثديية (خلايا الحيوانات الثديية)، وبشكلٍ أساسي خلايا مبيض الهامستر الصيني الخالدة (CHO)، للحاجة إلى إنتاج EPO و tPA في بدايات الثمانينيات [١٩٥]. وقد ساهمت التطورات السابقة في تقنية التخمير الميكروبي في تطوير زراعة الخلايا الثديية. وكانت زراعة الخلايا الثديية مفيدة في أن البروتينات تنتج في الصورة السليمة المطوية والمرتبطة بالجليكوزيل، وبالتالي القضاء على الحاجة لإعادة الطبيعة إليها. وتم أيضاً إنتاج البروتينات المعدلة بالخلايا الثديية في خلايا مايلوما الفئران N50، وخلايا كلى جنين الهامستر، وخلايا كلى القرد الأخضر، وخلايا الكلى الجنينية البشرية. وأصبحت زراعة الخلايا الثديية هي المصدر الرئيس للأدوية العلاجية المعدلة، واستخدمت لإنتاج هرمون النمو البشري، GM-CSF، G-CSF، EPO، والباموزيم، وغيرها. وقد تم تطوير عمليات لخلايا CHO والتي أنتجت ٣-٥ جم/ لتر من البروتين المعدل.

(٦, ١٠, ١) الحيوانات المعدلة وراثياً Transgenic Animals

تم تطوير الحيوانات المعدلة وراثياً كنظم إنتاج للببتيدات المعدلة. وتم تصنيع الـ tPA في حليب الماعز المعدلة وراثياً عند مستوى ٣ جم/ لتر. وتنتج الأبقار ٣٠ لتر من الحليب يومياً، وتصل فيها البروتينات إلى ٣٥ جم/ لتر؛ وبالتالي فإن البروتين الكلي المنتج في اليوم الواحد هو ١ كجم. وتصل الإنتاجية إلى ٢ جم/ لتر من مضاد الثرومبين الثالث، و٤ جم/ لتر من هرمون النمو البشري في حليب الفئران، و٥ جم/ لتر من الفيبرينوجين المعدل في حليب الأغنام، و٨ جم/ لتر من ألفا-جلوكوزيديز في حليب الأرانب، ١٤ جم/ لتر من مضاد الثرومبين الثالث في حليب الماعز، و٣٥ جم/ لتر من ألفا-١-مضاد التريبسين في حليب الأغنام، و٤٠ جم/ لتر من الهيموجلوبين في الخنازير؛ وكانت كل الجينات بشرية الأصل.

وفي معظم الحالات، فإن البروتين يكون نشطاً كالبروتين الأصلي. وتنتج الماعز المعدلة وراثياً tPA مع ارتباط بالجليكوزيل مختلف عن ذلك المنتج في زراعة الخلايا الحيوانية وذو فترة عمر-النصف أطول من البروتين الأصلي. وواحدة من النقاط السلبية في إنتاج البروتينات من الحيوانات المعدلة وراثياً هي طول الوقت اللازم لتقييم مستويات الإنتاج. فهذا يستغرق من ٣,٥ أشهر في الفئران، ١٥ شهراً في الخنازير، و٢٨ شهراً في الأغنام، و٣٢ شهراً في الأبقار.

(٧, ١٠, ١) النباتات المعدلة وراثياً Transgenic Plants

يمكن أيضاً استخدام النباتات المعدلة وراثياً لإنتاج منتجات قيمة، بما في ذلك إنزيم بيتا-جلوكورونيديز (GUS)، والأفيدين، وإنزيم اللاكيز، والتربسين. وقد استخدمت نباتات اللفت زيتية-البذور لإنتاج الإنكيفالين وببتيد عصبي. ويمكن إنتاج البروتينات المعدلة في النباتات المعدلة وراثياً بمستويات عالية بلغت ١٤٪ من إجمالي البروتين القابل للذوبان في التبغ (في حالة الفيتيز من أسبرجلس نيجر) و١٪ من وزن بذور الكانولا (الهيرودين من هيرودو ميديسيناليس). وتشمل المزايا المحتملة ارتباط الجليكوزيل بدرجة مُرضية، والاستهداف، والتقسيم، وطبيعية التخزين المستقرة.

(١١, ١) الإنزيمات Enzymes

تم صياغة مصطلح "إنزيم" في عام ١٨٧٧م من قبل كوهنه بمعنى "في الخميرة". وعندما ولد مجال الكيمياء الحيوية في عام ١٨٩٧م عن طريق اكتشاف بوخنر أن مستخلصات الخميرة الخالية من الخلايا يمكنها إنتاج الإيثانول من السكر، أشار بوخنر إلى مركب الإنزيم المحلل للجلوكوز بالـ"زيماز"، بمعنى "إنزيم الخميرة

نفسها". وأصبحت الإنزيمات قيمة في التصنيع بسبب عملها بسرعة وكفاءة في تركيزات منخفضة عند قيم رقم هيدروجيني ودرجات حرارة معتدلة، ودرجتها العالية من التخصصية للوسط (التي خفضت تكوين المنتجات الثانوية)، وسميتها المنخفضة، وسهولة إنهاء عملها بمعالجات معتدلة. وأنتجت بعض السلالات الميكروبية تركيزات عالية جداً من الإنزيمات خارج الخلية. فقد أنتجت السلالات الأصلية من باسيلس ليشينيفورميس ٥ جم/ لتر من إنزيم البروتييز، وأنتجت السلالات التجارية ٢٠ جم/ لتر. وأنتجت السلالات عالية الإنتاجية من الأسبرجلس ٢٠ جم/ لتر من إنزيم الجلوكوأميليز.

وكانت الأسباب الإضافية لاستخدام الخلايا الميكروبية كمصادر للإنزيمات على النحو التالي: (١) كانت تخميرات الإنزيم اقتصادية جداً على نطاقٍ واسعٍ بسبب قصر دورة التخمير والبيئات الغذائية غير المكلفة، (٢) كانت إجراءات الفرز بسيطة، ويمكن فحص الآلاف من الزراعات في فترة زمنية قصيرة معقولة، و(٣) أنتجت الأنواع المختلفة إنزيمات مختلفة بعض الشيء والتي تحفز نفس التفاعل، مما يسمح بالمرونة فيما يتعلق بشروط العمل في المفاعلات. وتجلى هذا التنوع من خلال حقيقة أن إنزيم ألفا-أميليز من باسيلس أميلوليكوفاشينس، وهو إنزيم تجاري يستخدم لسنواتٍ في التحليل المائي للنشا في درجة حرارة تصل إلى ٩٠ درجة مئوية، قد أجبر على المنافسة في ١٩٧٢م مع إنزيمٍ مماثلٍ من باسيلس ليشينيفورميس والذي يمكنه أن يعمل في ١١٠ درجة مئوية. وكانت درجات الحرارة المثلى لكلٍ من باسيلس أميلوليكوفاشينس وباسيلس ليشينيفورميس ٧٠ و٩٢ درجة مئوية، على التوالي.

في الثمانينيات والتسعينيات من القرن العشرين استخدمت الإنزيمات الميكروبية على نحوٍ متزايدٍ في التطبيقات التي كانت تستخدم الإنزيمات النباتية والحيوانية تقليدياً. وشملت هذه التحولات الاستبدال الجزئي لـ (١) إنزيمات الأميليز من الشعير المنقوع والقمح في صناعات البيرة، والخبز، والنسيج بالأميليز من الباسيلس والأسبرجلس، (٢) إنزيمات البروتيز النباتية والحيوانية ببروتيز الأسبرجلس للتعتيق البارد للبيرة وتطرية اللحوم، (٣) إنزيمات البروتيز من الأسبرجلس والباسيلس لضرب الجلود ومستحضرات المنظفات، و(٤) منفحة معدة العجل (الكيموسين) بإنزيمات الرينين من فطر الميوكر لصناعة الجبن. وفي وقتٍ لاحقٍ، أصبح استنساخ الكيموسين من الثدييات مهماً لصانعي الجبن، وأظهرت الاختبارات على الجبن المصنوع من الإنزيم المعدل نجاحاً تجارياً. وقد تم التصريح بالكيموسين المعدل في الولايات المتحدة، وكان سعره نصف السعر للكيموسين من العجل الطبيعي. وشملت الإنزيمات الصناعية المهمة التالي: (١) إنزيم مصاوغة الجلوكوز لإنتاج شراب الذرة عالي المحتوى من سكر الفركتوز، (٢) البنسيلين أسيليز لصناعة البنسيلينات شبه المخلقة، (٣) البيروكسيديز لصناعة راتنجات الفينول (والتي يمكن أن تستبدل فورمالدهيدات الفينول المخلقة) و(٤) هيدروليز النتريل

لإضافة الماء للأكريلونيتريل إلى الأكريلاميد. واستخدم إنزيم مصاوغة الجلوكوز بالتزامن مع ألفا-أميليز وجلوكوأميليز لتحويل النشا إلى مزيجٍ من الجلوكوز والفركتوز المعروفة باسم "شراب الذرة عالي المحتوى من سكر الفركتوز". وسمح تطوير إنزيم مصاوغة الجلوكوز لصناعة الطحن الرطب للذرة بالاستحواذ على ٣٠٪ من سوق المواد المحلية من صناعة السكر في السبعينيات. وفي الولايات المتحدة وحدها، يتم إنتاج شراب الذرة عالي المحتوى من سكر الفركتوز بحوالي ٣٠ مليار رطل في السنة.

ووصلت سوق الإنزيمات الصناعية ٢ مليار دولار أمريكي في عام ٢٠٠٠م مقسمة إلى مجالات التطبيق التالية: المواد الغذائية ٤٥٪ (تمثل معالجة النشا منها ١١٪)، مواد التنظيف ٣٤٪، المنسوجات ١١٪، الجلود ٣٪، لب الورق والورق ٢,١٪. ولا يشمل هذا الإنزيمات التشخيصية والعلاجية. وكانت السوق العالمية للمنتجات من التفاعلات الإنزيمية على النحو التالي: شراب الذرة عالي المحتوى من سكر الفركتوز بقيمة ١ مليار دولار، الأسبارتام ٨٠٠ مليون دولار، الأكريلاميد ٣٠٠ مليون دولار، حمض ٦-أمينو-بنسيلانيك (6-APA) وحمض ٧-أمينو-ديأسيتوكسي سيفالوسبورانيك (7ADCA) ٢٠٠ مليون دولار.

ويمكن أن تنمو بعض الكائنات الحية الدقيقة "في الظروف القاسية" مثل ١٠٠ درجة مئوية، ٤ درجات مئوية، ضغط جوي ٢٥٠، ودرجة قاعدية ١٠، ودرجة حموضة ٢، ٥٪ كلوريد الصوديوم. و"الإنزيمات العاملة في الظروف القاسية" هي الإنزيمات من هذه الكائنات المتنوعة ولها أهمية صناعية. كمثال تجاري إنزيم السيليوليز ١٠٣ من كائن ينمو في درجات القاعدية العالية. ويكسر الإنزيم الزغب المجهري لألياف السيليلوز والذي يحتفظ بالأوساخ على سطح المنسوجات القطنية. وتم تسويق الإنزيم تجارياً من قبل شركة جينينكور الدولية في عام ١٩٩٧م لاستخدامه في المنظفات الصناعية لإعادة "التجديد" للملابس القطنية حتى بعد الغسيل المتكرر.

ومع تطوير طريقة الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل أصبح من الممكن استنساخ الجينات التي تشفر الإنزيمات الميكروبية وتعبيرها على مستويات أعلى بمئات المرات من تلك التي تنتج بشكلٍ طبيعي. وتبني قطاع الإنزيمات الصناعية أساليب الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل بشغف لزيادة مستويات الإنتاج ولإنتاج الإنزيمات من كائنات دقيقة غير صناعية في كائنات صناعية، مثل أنواع الأسبرجلس، والترايكوديرما، فضلاً عن الكليفيروميسس لاكتيس، والسكاروميسس سيرفيسي، واليارووينيا ليبوليتيكا، والباسيلس ليشينيفورميس. ويتم إمداد أكثر من ٥٠٪ من السوق من خلال عمليات التهجين. ويتم تزويد ٦٠٪ من منفحة العجل (كيموسين) المستخدمة في صناعة الجبن في الولايات المتحدة من إيشيريشيا القولون المعدلة، وإثنين من إنزيمات الليبيز المستخدمة صناعياً (ليبيز الهوميكولا المنتج في الأسبرجلس، وليبيز البسودوموناس) من

الإنزيمات المعدلة. وتم إنتاج الأميليز الثابت عند درجات الحرارة العالية من الباسيلس ليشينيفورميس في سلالة متضاعفة الجينات من نفس النوع. ويستخدم الفيتيز النباتي (المنتج في أسبرجلس نيجر المعدل) كعلف لـ ٥٠٪ من جميع الخنازير في هولندا. وتم تحقيق زيادة ١٠٠٠ ضعف في إنتاج الفيتيز في أسبرجلس نيجر عن طريق استخدام تقنية التعديل الوراثي. وقد عزل العلماء في نوفو نورديسك ليبيز مرغوب فيه جداً لاستخدامه في المنظفات من جنس من الهوميكولا. ولأغراض الإنتاج، تم استنساخ الجين في أسبرجلس أوريزي حيث إنتج الإنزيم بزيادة قدرها ١٠٠٠ ضعف [١٩٩]. وأصبح منتجاً تجارياً لتنظيف الغسيل، وللأسترة الداخلية للدهون ولأسترة الجلوكوزيدات منتجاً ليبيدات جليكوزيلية لها تطبيقات كمستحلبات حيوية قابلة للتحلل للمنظفات، ومنتجات العناية بالبشرة، والعدسات اللاصقة، وكمستحلبات غذائية.

وتقريباً تحتوي جميع المنظفات الآن على إنزيمات مهندسة وراثياً ويصنع الكثير من الجبن بالميكروبات المهندسة وراثياً. أكثر من ٦٠٪ من الإنزيمات المستخدمة في صناعة المنظفات والمواد الغذائية والصناعات التحويلية للنشا منتجات معدلة [٢٠٠].

وقد تم تغيير خصائص الكثير من الإنزيمات بالوسائل الوراثية. وقد أدى تطفير "بروت فورس" والفحص العشوائي للكائنات الدقيقة على مدى السنوات إلى تغيرات في درجة الحموضة المثلى، والثبات الحراري، والتثبيط الرجعي، وتثبيط مصدر الكربون، وتخصصية وسط التفاعل، وسرعة التفاعل القصوى، وثابت التفاعل، وثابت تثبيط الإنزيم. وقد تم استغلال هذه المعلومات في التقنيات الأكثر منطقية لهندسة البروتين. وقد أسفرت التغيرات المفردة في تسلسل الأحماض الأمينية عن أنواع متشابهة من التغييرات في مجموعة كبيرة من الإنزيمات. فعلى سبيل المثال، زادت درجة تحمل الحرارة لإنزيم البروتيز من الباسيلس ستيروثيرموفيلوس من ٨٦ إلى ١٠٠ درجة مئوية، أي أنه أصبح مقاوماً لدرجة الغليان! وقد تم تطوير الإنزيم بواسطة التطفيرات الموجهه-المكان [٢٠١]. ووجب فقط تعديل ثمانية أحماض أمينية. وزاد الثبات عند ١٠٠ درجة مئوية بمقدار ٣٤٠ ضعف، ولم يقل في درجات الحرارة المنخفضة. وكانت جميع الطفرات الثمانية بعيدة عن الموقع النشط للإنزيم.

وكانت طريقة التطور الموجه (المعروفة أيضاً باسم التطور الجزيئي التطبيقي أو التطور الجزيئي الموجه) طريقة ممتازة لتحسين الإنزيمات [٢٠٢]. وحقق خلط الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي، وهو أحد أنواع التطور الموجه، تحسناً كبيراً في النشاط الحفزي، والتخصصية المعدلة، وتحسين ثبات الإنزيمات. وقد أثمرت طريقة تجميع وإعادة توحيد أجزاء من الجينات المماثلة من مختلف الأنواع أو السلالات هذه عن تحسينات ملحوظة في الإنزيمات في فترة قصيرة جداً من الزمن. وتحاكي هذه الطريقة الطبيعة فعلاً في أنها تستخدم الطفرة، والاختيار والتعديل لاستنباط بروتينات عالية التكيف، ولكنها كانت أسرع بكثيرٍ من الطبيعة. وتم تحسين النشاط الإنزيمي

حتى ٣٢٠٠٠ ضعف (بيتا-لاكتاميز TEM-1)، وتخصصية وسط التفاعل بـ ١٠٠٠ ضعف (بيتا-جالاكتوزيديز)، وطي البروتين بـ ٤٨ ضعف (البروتين الأخضر المستشع)، ونشاط الجسم المضاد أكثر من ٤٠٠ ضعف، والتعبير بـ ١٠٠ ضعف، ومقاومة الزرنيخات بـ ٤٠ ضعف، تحلل الأترازين بـ ٨٠ ضعف، ...إلخ [٢٠٣].

ودخلت البروتينات الناتجة من التطور الموجه لأول مرة إلـى السوق في عام ٢٠٠٠م. وكانت هذه هي البروتينات الخضراء المستشعة لشركة كلونيتيك ونوفو نورديسك، ليبيز الليبوبرايم®. ووفر التطور الـموجه نشاط بيتا-جلوكوزيديز إلى بيتا-جالاكتوزيديز، وحول إنزيم بيتا-جلوكورونيديز إلى إنزيم بيتا-جالاكتوزيديز، وأعطـي نشاط إنزيم الفوسفوليبيز إلى الليبيز، وحول إنزيم إندول-٣-جليسرول-فوسفات سينثيز إلى إنزيم مصاوغة الفوسفوريبوزايل أنثرانيليز [٢٠٤].

(١,١٢) التحويلات الحيوية Bioconversions

كان أول مثال على استخدام عملية حيوية تنافس عملية كيميائية في صناعة البتروكيماويات هو إنتاج مادة الأكريلاميد، والتي تنتج بـ ٢٠٠٠٠٠ طن سنوياً كمادة متجمعة، وكمكون في الألياف الصناعية، ومنظم للتربة، وكعامل إسترداد في صناعة البترول [٢٠٥]. وكان لاستخدام العملية الكيميائية للتحفيز بأملاح النحاس في الترطيب المائي للأكريلونيتريل بعض المشكلات المرتبطة بها. ونافس التحويل الحيوي التفاعل الكيميائي، حيث تم استخدام البسودوموناس كلوروررافيس B23 أو الرودوكوكاس رودوكراس J1، والذي تم فيه حث إنزيم النيتريل هيدراتيز بواسطة ميثأكريلاميد وتم تحفيز الترطيب المائي. وكان العائد التحويل أعلى من ٩٩,٩٩٪، وتم إجرائه عند درجة ١٠ مئوية، واستخدمت الخلايا عدة مرات. وكانت الإنتاجية ٦٥٦ جم/ لتر بعد عشر ساعات. واليوم، تستخدم التحويلات الحيوية على نطاقٍ واسعٍ في الصناعات الكيميائية. كما أنها أصبحت ضرورية للصناعة الكيميائية الدقيقة بسبب الطلب على المركبات الوسيطة وحيدة المصاوغة.

(١,١٣) اللقاحات Vaccines

تم تصنيع مولدات الأجسام المضادة البروتينية للقاحات عن طريق استنساخ وتعبير الجينات المشفرة لمولدات الأجسام المضادة السطحية للبكتيريا والفيروسات والطفيليات. كان أول لقاح وحيدي في السوق هو مولد الأجسام المضادة السطحية لفيروس التهاب الكبد باء، والذي أنتج في الخميرة. في عام ١٩٩٤م، وافقت وزارة الزراعة الأميركية على أول لقاح بيطري حي معدل وراثياً. واستخدم لقاح VectorVax FP-N، والمنتج بواسطة شركة سينترو، ناقل فيروس جدري الطيور، والذي تم حذف الجينين المسببين للمرض له، لإنتاج لقاح ضد فيروس جدري الطيور ومرض نيوكاسل.

(١٤, ١) علم ميكروبيولوجي الأنظمة Systems Microbiology

برز "علم ميكروبيولوجي الأنظمة" كمصطلح وكمجال علمي لوصف المفهوم الذي يستخدم قياسات مدى-الجينوم والقياسات الخلوية الواسعة في توضيح العمليات والآليات التي تقوم بها الخلايا الميكروبية [٢٠٦]. وأمكن النظر للخلية الميكروبية بصورة موسعة بسبب التقدم الهائل في (١) علم الجينوم وغيرها من تقنيات "الأوميات" (على سبيل المثال، البروتيوميات، الميتابولوميتات) و(٢) التقنيات عالية الإنتاجية لقياس الفئات المختلفة من الجزيئات الرئيسة داخل الخلية. ولاكتشاف نواتج أيض ثانوية نشطة جديدة ذات أهمية تجارية، فقد قدم علم الجينوم مجموعة هائلة من الأهداف الجديدة، والتي يتم فحص المنتجات الطبيعية ضدها. ويمتلك الجينوم البشري ٣٠٠٠٠-٣٥٠٠٠٠ من الجينات، وأقل من ٥٠٪ منها لديها وظيفة مفترضة. وتمتلك هذه الجينات القدرة على إنتاج ما يزيد على ١٠٠٠٠٠ من البروتينات. ويتراوح تقدير عدد البروتينات التي تعمل كأهداف مفيدة من ٦٠٠ إلى ١٠٠٠٠.

المراجع References

[١] Dixon, B. (2006) Sulfa's true significance. *Microbe*, **1**, 500–501.

[٢] Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.*, **10**, 226–236.

[٣] Florey, H.W., Chain, E.B., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P., and Florey, M.E. (1949) *Antibiotics*, vol. **2**, Oxford University Press, London.

[٤] Moyer, A.J. and Coghill, R.D. (1946) Penicillin. IX. The laboratory scaleproduction of penicillin in submerged cultures by *Penicillium notatum* Westling (NRRL 832). *J. Bacteriol.*, **51**, 79–93.

[٥] Raper, K.B. (1994) The development of improved penicillin-producing molds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **48**, 41–56.

[٦] Jarvis, F.G. and Johnson, M.J. (1947) The role of the constituents of synthetic media for penicillin production. *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 3010–3018.

[٧] Johnson, M.J. (1952) Recent advances in the penicillin fermentation. *Bull. World Health Organ.*, **6**, 99–121.

[٨] Davey, Y.F. and Johnson, M.J. (1953) Penicillin production in corn steep media with continuous carbohydrate addition. *Appl. Microbiol.*, **1**, 208–211.

[٩] Demain, A.L. (1957) Inhibition of penicillin formation by lysine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 244–246.

[١٠] Somerson, N.L., Demain, A.L., and Nunheimer, T.D. (1961) Reversal of lysine inhibition of penicillin production by α-aminoadipioc acid or adipic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 238–241.

[١١] Arnstein, H.R.V. and Morris, D. (1960) The structure of a peptide containing α-aminoadipic acid, cysteine and valine, present in the mycelium of *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. J.*, **76**, 357–361.

[١٢] Demain, A.L. and Masurekar, P.S. (1974) Lysine inhibition of *in vivo* homocitrate synthesis in *Penicillum chysogenum*. *J. Gen. Microbiol.*, **82**, 143–151.

[١٣] Friedrich, C.G. and Demain, A.L (1977) Effects of lysine analogs on *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 706–709.

[١٤] Kato, K. (1953) Occurrence of penicillin-nucleus in culture broths. *J. Antibiot. Ser. A*, **6**, 184–185.

[١٥] Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Nayler, J.H.C., and Rolinson, G.N. (1959) Synthesis of penicillin: 6-amino-penicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature*, **183**, 257–258.

[١٦] Brotzu, G. (1948) Richerche su di un nova antibiotico. *Lavori delll'Instituto d'Igienee di Cagliari.*, **1,** 1–11.

obeikandl.com

[١٧] GottshallR. Y., Roberts, J.M., Portwood, L.M., and Jennings, J.C. (1951) Synnematin, an antibiotic produced by *Tilachlidium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **76,** 307–311.

[١٨] Roberts, J.M. (1952) Antibiotic substances produced by species of *Cephalosporium* with a description of new species. *Mycologia,* **44,** 292–306.

[١٩] Burton, H.S. and Abraham, E.P. (1951) Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium.* Cephalosporins P1, P2, P3, P4 and P5. *Biochem. J.,* **50,** 168–174.

[٢٠] Crawford, K., Heatley, N.G., Boyd, P.F., Hale, C.W., Kelly, B.K., Miller, G.A., and Smith, N. (1952) Antibiotic production by a species of *Cephalosporium*. *J. Gen. Microbiol.,* **6,** 47–59.

[٢١] Abraham, E.P., Newton, G.G.F., and Hale, C.W. (1954) Isolation and some properties of cephalosporin N, a new penicillin. *Biochem. J.*, **58,** 94–102.

[٢٢] Abraham, E.P., Newton, G.G.F., Schenck, J.R., Hargie, M.P., Olson, B.H., Schuurmans, D.M., Fisher, M.W., and Fusari, S.A. (1955) Identity of cephalosporin N and synnematin B. *Nature,* **176,** 551.

[٢٣] Abraham, E.P. and Newton, G.G.F. (1961) The structure of cephalosporin C. *Biochem. J.,* **79,** 377–393.

[٢٤] Fawcett, P.A., Usher, J.J., and Abraham, E.P. (1976) Aspects of cephalosporin and penicillin biosynthesis, in *International Symposium on theGenetics of Industrial Microorganisms,* 2nd edn (ed. K.D. MacDonald), Academic Press, New York, pp. 129–138.

[٢٥] Kohsaka, M. and Demain, A.L. (1976) Conversion of penicillin N to cephalosporin(s) by cell-free extracts of *Cephalosporium acremonium. Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **70,** 465–473.

[٢٦] Yoshida, M., Konomi, T., Kohsaka, M., Baldwin, J.E., Herchen, S., Singh, P., Hunt, N.A., and Demain, A.L. (1978) Cell-free ring expansion of penicillin N to deacetoxycephalosporin C by *Cephalosporium acremonium* CW-19 and its mutants. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **75,** 6253–6257.

[٢٧] Miller, G.A., Kelly, B.K., and Newton, G.G.F. (1956) Cephalosporin production, British Patent 759, 624.

[٢٨] Demain, A.L. (1963) L-Valine: a precursor of cephalosporin C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **10,** 45–48.

[٢٩] Trown, P.W., Abraham, E.P., Newton, G.G.G., Hale, C.W., and Miller, G.A. (1962) Incorporation of acetate into cephalosporin C. *Biochem. J.,* **84,** 157–166.

[٣٠] Trown, P.W., Sharp, M., and Abraham, E.P. (1963) α-Oxoglutarate as a precursor of the D-α-aminoadipic residue in cephalosporin C. *Biochem. J.,* **86,** 280–284.

[٣١] Banko, G., Demain, A.L., and Wolfe, S. (1987) α-(L-α-Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (ACV synthetase): a multifunctional enzyme with broad substrate specificity for the synthesis of penicillin and cephalosporin precursors. *J. Am. Chem. Soc.,* **109,** 2858–2860.

[٣٢] Hollander, I.J., Shen, Y.-Q., Heim, J., Demain, A.L., and Wolfe, S. (1984) A pure enzyme catalyzing penicillin biosynthesis. *Science,* **224,** 610–612.

[٣٣] Miller, I.M., Stapley, E.O., and Chaiet, L. (1962) Production of synnematin B by a member of the genus *Streptomyces. Bacteriol. Proc.,* **49,** 32.

[٣٤] Nagarajan, R., Boeck, L.D., Gorman, M., Hamill, R.L., Higgens, C.H., Hoehn, M.M., Stark, W.M., and Whitney, J.G. (1971) β-Lactam antibiotics from *Streptomyces. J. Am. Chem. Soc.*, **93,** 2308–2310.

[٣٥] Stapley, E.O., Jackson, M., Hernandez, S., Zimmerman, S.B., Currie, S.A., Mochales, S., Mata, J.M., Woodruff, H.B., and Hendlin, D. (1972) Cephamycins, a new family of β-lactam antibiotics. I. Production by actinomycetes, including *Streptomyces lactamdurans* sp. n. *Antimicrob. Agents Chemother.,* **2,** 122–131.

[٣٦] Bost, P.E. and Demain, A.L. (1977) Studies on the cell-free biosynthesis of β-lactam antibiotics. *Biochem. J.,* **162,** 681–687.

[٣٧] Kahan, F.S., Kahan, F.M., Goegelman, R.T., Currie, S.A., Jackson, M., Stapley, E.O., Miller, T.W., Miller, A.K., Hendlin, D., Mochales, S., Hernandez, S., Woodruff, H.B., and Birnbaum, J. (1979) Thienamycin, a new β-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation, and physical properties. *J. Antibiot.,* **32,** 1–12.

[٣٨] Waksman, S.A. and Woodruff, H.B. (1940) Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomyces. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **45,** 609–614.

[٣٩] Schatz, A., Bugie, E., and Waksman, S.A. (1944) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* 55–66.

[٤٠] Waksman, S.A. and Lechevalier, H.A. (1949) Neomycin, a new antibiotic against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science*, **109,** 305–307.

[٤١] Lechevalier, H., Acker, R.F., Corke, C.T., Haenseler, C.M., and Waksman, S.A. (1953) Candicidin, a newantifungal antibiotic. *Mycologia*, **45,** 155–171.

[٤٢] Ehrlich, J., Bartz, Q.R., Smith, R.M., Joslyn, D.A., and Burkholder, P.R. (1947) Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science*, **106,** 417.

[٤٣] Duggar, B.M. (1948) Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51,** 177–181.

[٤٤] McGuire, J.M., Bunch, R.L., Anderson, R.C., Boaz, H.E., Flynn, E.H., Powell, H.M., and Smith, J.W. (1952) " Ilotycin " a new antibiotic. *Antibiot. Chemother.*, **2,** 281.

[٤٥] McCormick, M.H., Stark, W.M., Pittenger, G.E., Pittenger, R.C., and McGuire, J.M. (1956) Vancomycin, a new antibiotic. 1. Chemical and biologic properties. *Antibiot. Annu.*, **1955/56,** 606.

[٤٦] Weinstein, M.J., Luedemann, G.M., Oden, E.M., Wagman, G.H., Rosselet, J.R., Marquez, J.A., Coniglio, C.T., Charney, W., Herzog, H.L., and Black, J. (1963) Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora. J. Med. Chem.*, **6,** 463.

[٤٧] Sensi, P., Margalith, P., and Timbal, M.T. (1959) Rifomycin, a new antibiotic. Preliminary report. *Il Farmaco (Ed. Sci.)*, **14,** 146–147.

[٤٨] Hazen, E.L. and Brown, R. (1951) Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76,** 93–97.

[٤٩] Berdy, J. (1995) Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? in *Proceedings of the 9th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Part 1*, Allerton Press, New York, pp. 3–23.

[٥٠] Demain, A.L. (1973) Mutation and the production of microbial metabolites. *Adv. Appl. Microbiol.*, **16,** 177–202.

[٥١] Kelner, A. (1949) Studies on the genetics of antibiotic formation. 1. The introduction of antibiotic-forming mutants in actinomycetes. *J. Bacteriol.*, **57,** 73–92.

[٥٢] McCormick, J.R.D., Sjolander, N.O., Hirsch, U., Jensen, E., and Doershuk, A.P. (1957) A new family of antibiotics: the demethyltetracyclines. *J. Am. Chem. Soc.*, **79,** 4561–4563.

[٥٣] Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., and Spalla, C. (1969) 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.*, **11,** 1101–1110.

[٥٤] Shier, W.T., Rinehart, K.L., and Gottlieb, D. (1969) Preparation of four new antibiotics from a mutant of *Streptomyces fradiae. Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **63,** 198–204.

[٥٥] McArthur, H.A.I. (1997) The novel avermectin, Doramectin–a successful application of mutasynthesis. Abstract S13 at *5th International Conference on the Biotechnology of Microbial Products. Williamsburg, VA, USA.* p. 20.

[٥٦] Okanishi, M., Suzuki, K., and Umezawa, H. (1974) Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.*, **80,** 389–400.

[٥٧] Hopwood, D.A. (1988) Towards an understanding of gene switching in Streptomyces; the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. (Lond.)*, **235,** 121–138.

[٥٨] Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujui, I., Rudd, B.A.M., Floss, H.G., and Omura, S. (1985) Production of hybrid antibiotics by genetic engineering. *Nature*, **314,** 642–644.

[٥٩] Floss, H.G. (2006) Combinatorial biosynthesis–potential and problems. *J. Biotechnol.*, **124,** 242–257.

[٦٠] Dougherty, T.J., and Barrett, J.F. (2001) ABT-773: a new ketolide antibiotic. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **10,** 343–351.

[٦١] Nichterlein, T., Kretschmar, M., and Hof, H. (1996) RP 59500, a streptogramin derivative, is effective inmurine listerosis. *J. Chemother.*, **8,** 107–112.

[٦٢] Petersen, P.J., Jacobus, N.V., Weiss, W.J., Sum, P.E., and Testa, R.T. (1999) *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of a novel glycylcycline, the 9-*t*-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43,** 738–744.

[٦٣] Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M. (1957) Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3,** 193–205.

[٦٤] Somerson, N. and Phillips, T. (1961) Belgian Patent No. 593, 807.

[٦٥] Shiio, I., Otsuka, S.I., and Takahashi, M. (1962) Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.,* **51,** 109–111.

[٦٦] Demain, A.L. and Birnbaum, J. (1968) Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cell. *Curr. Top. Microbiol.,* **46,** 1–25.

[٦٧] Kitano, K., Sugiyama, Y., and Kanzaki, T. (1972) L-Glutamate fermentation with acetic acid by an oleic acid requiring mutant. II. Inhibitory factors against the extracellular accumulation of L-glutamate. *J. Ferment. Technol.,* **50,** 182–191.

[٦٨] Nakao, Y., Kikuchi, M., Suzuki, M., and Doi, M. (1972) Microbial production of L-glutamic acid by glycerol auxotrophs and production of L-glutamic acid from *n*-paraffi ns. *Agric. Biol. Chem.,* **36,** 490–496.

[٦٩] Laneelle, G. and Clement, Y. (1986) Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum,* in *5th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Part B.,* Pliva, Eagreb, Croatia, pp. 247–252.

[٧٠] Eggeling, L. and Sahm, H. (2001) The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosci. Bioeng.,* **92,** 201–213.

[٧١] Nampoothiri, K.M., Hoischen, C., Bathe, B., Moeckel, B., Pfefferle, W., Krumbach, K., Sahm, H., and Eggeling, L. (2002) Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum. Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **58,** 89–96.

[٧٢] Burkovski, A. and Kraemer, R. (2002) Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and signifi cance for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **58,** 265–274.

[٧٣] Kinoshita, S., Nakayama, K., and Kitada, S. (1958) L-Lysine production using microbial auxotroph. *J. Gen. Appl. Microbiol.,* **4,** 128–129.

[٧٤] Sahm, H., Eggeling, L., and de Graaf, A.A. (2000) Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum. Biol. Chem.,* **381,** 899–910.

[٧٥] Stephanopoulos, G. (1999) Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab. Eng.,* **1,** 1–11.

[٧٦] Nielsen, J. (2001) Metabolic engineering . *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **55,** 263–283.

[٧٧] Kacser, H. and Acerenza, L. (1993) A universal method for achieving increases in metabolite production. *Eur. J. Biochem.,* **216,** 361–367.

[٧٨] Wittmann, C. and Heinzle, E. (2002) Geneology profling through strain improvement using metabolic network analysis–metabolic flux geneology of several generations of lysine producing corynebacteria. *Appl. Environ.Microbiol.,* **68,** 5843–5859.

[٧٩] Eggeling, L. and Sahm, H. (1999) Amino acid production: principles of metabolic engineering, in *Metabolic Engineering* (eds S.Y. Lee and E.T. Papoutsakis), Marcel Dekker, New York, pp. 153–176.

[٨٠] Kuninaka, A. (1960) Studies on taste of ribonucleic acid derivatives. *Nippon Nogeikagaku Kaishi,* **34,** 489–492.

[٨١] Kuninaka, A., Kibi, M., and Sakaguchi, K. (1964) History and development of flavor nucleotides. *Food Technol.,* **19,** 29–35.

[٨٢] Nakayama, K., Suzuki, T., Sato, Z., and Kinoshita, S. (1964) Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes. 5. Accumulation of inosinic acid by an adenine auxotroph of *Micrococcus glutamicus. J. Gen. Appl. Microbiol.,* **10,** 133.

[٨٣] Demain, A.L., Jackson, M., Vitali, R.A., Hendlin, D., and Jacob, T.A. (1965) Production of xanthosine-5 ′-monophosphate and inosine-5 ′-monophosphate by auxotrophic mutants of a coryneform bacterium. *Appl. Microbiol.,* **13,** 757.

[٨٤] Demain, A.L., Jackson, M., Vitali, R.A., Hendlin, D., and Jacob, T.A. (1966) Production of guanosine-5 ′-monophosphate and inosine-5 ′- monophosphate by fermentation. *Appl. Microbiol.,* **14,** 821.

[٨٥] Demain, A.L. (1968) Production of purine nucleotides by fermentation. *Prog. Ind. Microbiol.,* **8,** 35.

[٨٦] Guilliermond, A., Fontaine, M., and Raffy, A. (1935) Sur l'existence dans *l'Eremothecium ashbyii* d'un pigment jaune se rapportant au groupe des flavines. *Compt. Rend.,* **201,** 1077–1080.

[٨٧] Perlman, D. (1979) Microbial process for ribofl avin production, in *MicrobialTechnology,* vol. **I,** 2nd edn (eds J.H. Peppler and D. Perlman), Academic Press, New York, pp. 521–527.

[٨٨] Wickerham, L.J., Flickinger, M.H., and Johnston, R.M. (1946) The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Arch. Biochem.,* **9,** 95–98.

[٨٩] Demain, A.L. (1972) Ribofl avin oversynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.*, **26,** 369–398.

[٩٠] Koizumi, S., Yonetani, Y., Maruyama, A., and Teshiba, S. (2000) Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51,** 674–679.

[٩١] Perkins, J.B. and Pero, J. (1993) Biosynthesis of riboflavin, biotin, folic acid and cobalamin, in *Bacillus subtilis and Other Gram Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics* (ed. A.L. Sonenshein), ASM Press, Washington, DC, pp. 319–334.

[٩٢] Perkins, J.B., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K., Zachgo, E., Erdenberger, T., Hannett, N., Chatterjee, N.P., Williams, V., II, Rufo, G.A., Jr., Hatch, R., and Pero, J. (1999) Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of ribofl avin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **22,** 8–18.

[٩٣] Huembelin, M., Griesser, V., Keller, T., Schurter, W., Haiker, M., Hohmann, H.-P., Ritz, H., Richter, G., Bacher, G., and van Loon, A.P.G.M. (1999) GTP cyclohydrolase II and 3.4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are the rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **22,** 1–7.

[٩٤] Scott, A.I., and Roessner, C.A. (2002) Biosynthesis of cobalamin (vitamin B 12). *Biochem. Soc. Trans.*, **30,** 613–620.

[٩٥] Long, R. Merck & Co., Inc, personal communication.

[٩٦] Demain, A.L., Daniels, H.J., Schnable, L., and White, F. (1968) Specificity of the stimulatory effect of betaine on the vitamin B 12 fermentation. *Nature*, **220,** 1324–1325.

[٩٧] Reichstein, T., Gruessner, A., and Opppenauer, R. (1933) Die Synthese der D-Ascorbinsaeure (D-Form des C-Vitamins). *Helv. Chim. Acta*, **16,** 561–565.

[٩٨] Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S., and Sahm, H. (2006) The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *J. Biotechnol.*, **124,** 196–205.

[٩٩] Sonoyamana, T., Tani, H., Matsuda, K., Kageyama, B., Tanimoto, M., Kobayashi, K., Yagi, S., Kyotani, H., and Mitsushima, K. (1982) Production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose by two-stage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43,** 1064–1069.

[١٠٠] Xu, A., Yao, J., Yu, L., Lu, S., Wang, J., Yan, B., and Yu, Z. (2004) Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in a two-step process of L-ascorbic acid manufacture by ion beam. *J. Appl. Microbiol.*, **96,** 1317–1323.

[١٠١] Chotani, G., Dodge, T., Hsu, A., Kumar, M., LaDuca, R., Trimbur, D., Weyler, W., and Sanford, K. (2000) The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim. Biophys. Acta*, **1543,** 434–455.

[١٠٢] Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Imao, Y., Akashi, T., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Soeda, S., Yoshida, M., Niwa, M., Hosada, J., and Shimomura, K. (1997) Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63,** 454–460.

[١٠٣] Miall, L.M. (1978) Organic acids, in *Economic Microbiology vol. 1 Primary Metabolite* (ed. A.H. Rose), Academic Press, New York, pp. 47–119.

[١٠٤] Mattey, M. (1992) The production of organic acids. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **12,** 87–132.

[١٠٥] Roehr, M. (1998) A century of citric acid fermentation and research. *Food Technol.*, **36,** 163–171.

[١٠٦] Magnuson, J.K. and Lasure, L.L. (2004) Organic acid production by filamentous fungi, in *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine* (eds J. Lange and L. Lange), Kluwer, Dordrecht, pp. 307–340.

[١٠٧] Thom, C. and Currie, J.N. (1916) *Aspergillus niger* group. Oxalic acid production of species of *Aspergillus. J. Agric. Res.*, **7,** 1–15.

[١٠٨] Fernbach, A. and Yuill, J.L. (1927) Rowntree and Co., British Patent 266,414.

[١٠٩] Fernbach, A. and Yuill, J.L. (1927)Rowntree and Co., British Patent 266,415.

[١١٠] Clutterbuck, P.W. (1936) Recent developments in the biochemistry of moulds. *J. Soc. Chem. Ind.*, **55,** 55T–67T.

[١١١] Doelger, W.P. and Prescott, S.C. (1934) Citric acid fermentation. *Ind. Eng. Chem.*, **26,** 1142.

[١١٢] Tomlinson, V., Campbell, J.J.R., and Trussell, P.C. (1950) The influence of zinc, iron, copper and manganese on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *J. Bacteriol.*, **59,** 517–527.

[١١٣] Adiga, P.R., Sivarama Sastry, K., Venkatasubramanyam, V., and Sarma, P.S. (1961) Interrelationships in trace-element metabolism in *Aspergillus niger*. *Biochem. J.*, **81,** 545–550.

[١١٤] Amelung, H. (1930) Wachstum und Saeurbildung von *Aspergillus* niger. *Chem.-Ztg.*, **54,** 118.

[١١٥] Kluyver, A.J. and Perquin, L.H.C. (1933) Methods for the study of the metabolism of molds. *Biochem. Z.*, **266,** 68–81.

[١١٦] Perlman, D., Dorell, W.W., and Johnson, M.J. (1946) Effect of metallic ions on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem.*, **10,** 131–143.

[١١٧] Shu, P. and Johnson, M.J. (1948) Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*.*Ind. Eng. Chem*, **40,** 1202–1205.

[١١٨] Miles Laboratories (1951) British Patent 653,808.

[١١٩] James, L.V., Rubbo, S.D., and Gardner, J.F. (1956) Isolation of high yielding mutants of *Aspergillus niger* by a paper culture selection technique. *J. Gen. Microbiol.*, **14,** 223–228.

[١٢٠] Hannan, M.A., Rabbi, F., Faizur Rahman, A.T.M., and Choudhury, N. (1973) Analyses of some mutants of *Aspergillus niger* for citric acid production. *J. Ferm. Technol.*, **51,** 606–608.

[١٢١] Duppenmeier, U., Hoffmeister, M., and Prust, M.C. (2002) Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60,** 233–242.

[١٢٢] Fukaya, M., Tayama, K., Tamaki, T., Tagami, H., Okumura, H., Kawamura, Y., and Beppu, T. (1989) Cloning of the membrane-bound aldehyde dehydrogenase gene of *Acetobacter polyoxogenes* and improvement of acetic acid production by use of the cloned gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55,** 171–176.

[١٢٣] Wieringa, K.T. (1940) The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **6,** 251–262.

[١٢٤] Fontaine, F.E., Peterson, W.H., McCoy, E., Johnson, M.J., and Ritter, G.J. (1942) A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n. sp. *J. Bacteriol.*, **43,** 701–715.

[١٢٥] Wang, D.I.C., Fleischaker, R.J., and Wang, G.Y. (1978) A novel route to the production of acetic acid by fermentation. *AIChE Symp. Ser.*, **74,** 105–110.

[١٢٦] Parekh, S.R. and Cheryan, M. (1994) High concentrations of acetate with a mutant strain of *C. thermoaceticum*. *Biotechnol. Lett.*, **16,** 139–142.

[١٢٧] Cheryan, M., Parekh, S., Shah, M., and Witjitra, K. (1997) Production of acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Adv. Appl. Microbiol.*, **43,** 1–33.

[١٢٨] Lister, J. (1878) On the lactic fermentation and its bearing on pathology. *Trans. Path. Soc. London*, **29,** 425–467.

[١٢٩] Ge, C.-M., Gu, S.-B., Zhou, X.-H., Yao, J.-M., Pan, R.-R., and Yu, Z.-L. (2004) Breeding of L (+)-lactic acid producing strain by low-energy ion implantation. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **14,** 363–366.

[١٣٠] Bai, D.-M., Zhao, X.-M., Li, X.-G., and Xu, S.-M. (2004) Strain improvement and metabolic flux analysis in the wild-type and a mutant *Lactobacillus lactis* strain for L (+)-lactic acid production. *Biotechnol. Bioeng.*, **88,** 681–689.

[١٣١] Zhou, S., Causey, T.B., Hasona, A., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. (2003) Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69,** 399–407.

[١٣٢] Schlenk, F. (1985) Early research on fermentation–a story of missed opportunities. *Trends Biochem. Sci.*, **10,** 252–254.

[١٣٣] Lynd, L.R. (1990) Large scale fuel ethanol from lignocellulose: potential, economics, and research priorities. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/25,** 695.

[١٣٤] Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., and Preston, J.F. (1987) Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53,** 2420–2425.

[١٣٥] Doran, J.B. and Ingram, L.O. (1993) Fermentation of crystalline cellulose to ethanol by *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes. *Biotechnol. Prog.*, **9,** 533–538.

[١٣٦] Lynd, L.R. (1989) Production of ethanol from lignocellulosic materials using thermophilic bacteria: critical evaluation of potential and review. *Adv. Biochem. Eng.*, **38,** 1–52.

[١٣٧] Demain, A.L., Newcomb, M., and Wu, J.H.D. (2005) Cellulase, clostridia and ethanol. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, **69,** 124–154.

[١٣٨] Kataeva, I.A., Seidel, R.D., III, Li, X.-L., and Ljungdahl, L.G. (2001) Properties and mutation analysis of the CelK cellulose-binding domain from the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *J. Bacteriol.,* **183,** 1552–1559.

[١٣٩] Shoham, Y., Lamed, R., and Bayer, E.A. (1999) The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol.,* **7,** 275–281.

[١٤٠] Qureshi, N., Li, X.-L., Hughes, S., Saha, B.C., and Cotta, M.A. (2006) Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum. Biotechnol. Prog.,* **22,** 673–680.

[١٤١] Lovitt, R.W., Kim, B.H., Shen, G.-J., and Zeikus, J.G. (1988) Solvent production by microorganisms. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.,* **7,** 107–186.

[١٤٢] Mermelstein, L.D., Papoutsakis, E.T., Petersen, D.J., and Bennett, G.N. (1993) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon. *Biotechnol. Bioeng.,* **42,** 1053–1060.

[١٤٣] Sanford, K., Valle, F., and Ghirnikar, R. (2004) Pathway engineering through rational design. Tutorial: designing and building cell factories for biobased production. *Gen. Eng. News,* **24** (2), 44–45.

[١٤٤] Bigelas, R. (1989) Industrial products of biotechnology: application of gene technology, in *Biotechnology,* vol. **7b** (eds G.K. Jacobson and S.O. Jolly), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 230–259.

[١٤٥] Tseng, Y.H., Ting, W.Y., Chou, H.C., Yang, B.Y., and Chun, C.C. (1992) Increase of xanthan production by cloning *xps* genes into wild-type *Xanthomonas campestris. Lett. Appl. Microbiol.,* **14,** 43–46.

[١٤٦] Dawes, E.A. (1988) Polyhydroxybutyrate: an intriguing biopolymer. *Biosci. Rep.,* **8,** 537–547.

[١٤٧] Pedros-Alio, C., Mas, J., and Guerrero, R. (1985) The infl uence of poly-β-hydoxybutyrate accumulation on cell volume and buoyant density in *Alcaligenes eutrophus. Arch. Microbiol.,***143,** 178–184.

[١٤٨] Nakamura, C.E. and Whited, G.M. (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.,* **14,** 1–6.

[١٤٩] Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H., and Frank, J.R. (1995) The technological and economic potential of poly(lactic acid) and its derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.,* **16,** 221–231.

[١٥٠] De Muynck, C., Pereira, C., Soetaert, W., and Vandamme, E. (2006) Dehydrogenation of ribitol with *Gluconobacter oxydans*: production and stability of L-ribulose. *J. Biotechnol.,* **125,** 408–415.

[١٥١] Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., and Vandamme, E.J. (2005) *Leuconostoc* dextran sucrase and dextran: production, properties and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.,* **80,** 845–860.

[١٥٢] Vandamme, E.J., and Soetaert, W. (2006) Personal care products via fermentation and biocatalysis processes, in *Biotechnology in Personal Care* (ed. R. Lad), Informa/Taylor and Francis, New York, pp. 27–56.

[١٥٣] Soetaert, W. and Vandamme, E. (2006) The impact of industrial biotechnology. *Biotechnol. J.,* **1,** 756–769.

[١٥٤] Vandamme, E.J., Cerdobbel, A., and Soetaert, W. (2005) Biocatalysis on the rise: part 1-principles. *Chem. Today,* **23** (6), 47–51.

[١٥٥] Vandamme, E.J., Cerdobbel, A., Soetaert, W. (2006) Biocatalysis on the rise: part 2-applications. *Chem. Today,* **24** (1), 57–61.

[١٥٦] Umezawa, H. (1972) *Enzyme Inhibitors of Microbial Origin,* University Park Press, Baltimore.

[١٥٧] Umezawa, H. (1982) Low-molecular-weight inhibitors of microbial origin. *Annu. Rev. Microbiol.,* **36,** 75–99.

[١٥٨] Omura, S. (1992) Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. Ind. Microbiol.,* **10,** 135–156.

[١٥٩] Brown, A.G., Smale, T.C., King, T.J., Hasenkamp, R., and Thompson, R.H. (1976) Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum. J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1,* 1165–1170.

[١٦٠] Endo, A., Kuroda, M., and Tsujita, Y. (1976) ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinin. J. Antibiot.,* **29,** 1346–1348.

[١٦١] Endo, A. (1979) A new hypocholsterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Antibiot.,* **32,** 852–854.

[١٦٢] Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfi eld, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., and Springer, J. (1980) Mevinolin, A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **77,** 3957–3961.

[١٦٣] Serizawa, N. and Matsuoka, T. (1991) A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Biochem. Biophys. Acta,* **1084,** 35–40.

[١٦٤] Yashphe, J., Davis, J., Peng, Y., Bok, S.H., and Demain, A.L. (1997) New microorganisms which convert compactin to pravastatin. *Actinomycetologica*, **11,** 20–25.

[١٦٥] Peng, Y. and Demain, A.L. (1998) A new hydroxylase system in *Actinomadura* sp. cells converting compactin to pravastatin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **20,** 373–375.

[١٦٦] Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D.D., andWingender, W. (1981) Chemistry and biochemistry of microbial α-glucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,* **20,** 744–761.

[١٦٧] Weibel, E.K., Hadvary, P., Hochuli, E., Kupfer, E., and Lengsfeld, H. (1987) Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini. J. Antibiot.,* **40,** 1081–1085.

[١٦٨] Brown, A.G. (1986) Clavulanic acid, a novel β-lactamase inhibitor–a case study in drug discovery and development. *Drug Des. Dev.,* **1,** 1–21.

[١٦٩] Isono, K., Nagatsu, J., Kawashima, Y., and Suzuki, S. (1965) Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. 1. Isolation and characterization of polyoxins A and B. *Agric. Biol. Chem.*, **29,** 848–854.

[١٧٠] Winkelmann, G. (1986) Iron complex products (siderophores), in *Biotechnology* , vol. **4** (eds H.J. Rehm, and G.Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 215–243.

[١٧١] Borel, J.F., Feurer, C., Gabler, H.U., and Stahelin, H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions,* **6,** 468–475.

[١٧٢] Vezina, D., Kudelski, A., and Sehgal, S.N. (1975) Rapamycin (AY 22,989), a new antifungal antibiotic. 1. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.*, **28,** 721–726.

[١٧٣] Sehgal, S.N., Molnar-Kimber, K., Ocain, T.D., and Weichman, B.M. (1994) Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide. *Med. Res. Rev.*, **14,** 1–22.

[١٧٤] Paiva, N.L., Demain, A.L., and Roberts, M.F. (1991) Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Nat. Prod.*, **54,** 167–177.

[١٧٥] Paiva, N.L., Roberts, M.F., and Demain, A.L. (1993) The cyclohexane moiety of rapamycin is derived from shikimic acid in *Streptomyces hygroscopicus. J. Ind. Microbiol.*, **12,** 423–428.

[١٧٦] Paiva, N.L., Demain, A.L., and Roberts, M.F. (1993) The immediate precursor of the nitrogen-containing ring of rapamycin is free pipecolic acid. *Enzyme Microb. Technol.*, **15,** 581–585.

[١٧٧] Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H., and Imanaka, H. (1987) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces.* 1. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.*, **40,** 1249–1255.

[١٧٨] Bentley, R. (2001) Bartolomeo Gosio, 1863–1944: an appreciation. *Adv. Appl. Microbiol.,* **48,** 229–250.

[١٧٩] Alsberg, C.L. and Black, O.F. (1913) Contributions to the study of maize deterioration. Biochemical and toxological investigations of *Penicillium puberulum* and *Penicillium stoloniferum,* USDA Bur. Plant Ind., Bull. No. 270, Govt. Printing Ofc. Washington, DC.

[١٨٠] Rayl, A.J.S. (1999) Oceans: medicine chests of the future? *Scientist*, **13** (19), 1–4.

[١٨١] Wall, M.E. and Wani, M.C. (1995) Campothecin and taxol: discovery to clinic. *Cancer Res.,* **55,** 753–760.

[١٨٢] Stierle, A., Strobel, G., and Stierle, D. (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae,* an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, **260,** 214–216.

[١٨٣] Borman, S. (2000) Enediyne research continues apace. *Chem. Eng. News*, **78** (11), 47–49.

[١٨٤] Vining, L.C. and Taber, W.A. (1979) Ergot alkaloids, in *Economic Microbiology, Secondary Products of Metabolism,* vol. **3** (ed. A.H. Rose), Academic Press, London, pp. 389–420.

[١٨٥] Kondo, Y., Shomura, T., Ogawa, Y., Tsuruoka, T., Watanabe, H., Totukawa, K., Suzuki, T., Moriyama, C., Yoshida, J., Inouye, S., and Nida, T. (1973) Studies on a new antibiotic SF-1293. I. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substances. *Sci. Rep. Meiji Seika*, **13,** 34–41.

[١٨٦] Bayer, E., Gugel, K.H., Hagele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., Konig, W.A., and Zahner, H. (1972) Stoffwechselprodukte von mikroorganismen. Phosphinothricin und phosphinothricylalanin-alanin. *Helv. Chim. Acta*, **55,** 224–239.

[١٨٧] Jefferys, E.G. (1970) The gibberellins fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.*, **13,** 283–316.

[١٨٨] Haney, M.E., Jr and Hoehn, M.M. (1967) Monensin, a new biologically active compound. 1. Discovery and isolation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7,** 349–352.

[١٨٩] Westley, J.W. (1977) Polyether antibiotics: versatile carboxylic acid ionophores produced by *Streptomyces. Adv. Appl. Microbiol.*, **22,** 177–223.

[١٩٠] Ikeda, H. and Omura, S. (1997) Avermectin biosynthesis. *Chem. Rev.*, **97,** 2591–2609.

[١٩١] Stapley, E.O. (1982) Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolated from a soil in Japan, in *Trends in Antibiotic Research* (eds H. Umezawa, A.L. Demain, R. Hata, and C.R. Hutchinson), Japan Antibiotic Research Association, Tokyo, pp. 154–170.

[١٩٢] Campbell, W.C. (ed.) (1989) *Ivermectin and Abamectin*, Springer-Verlag, New York.

[١٩٣] Kirst, H.A., Michel, K.H., Mynderase, J.S., Chio, E.H., Yao, R.C., Nakasukasa, W.M., Boeck, L.D., Occlowitx, J.L., Paschal, J.W., Deeter, B., and Thompson, G.D. (1992) Discovery, isolation, and structure elucidation of a family of structurally unique, fermentation-derived tetracyclic macrolides, in *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III* (eds D.R. Baker, J.G. Fenyes, and J.J. Steffens), ACS Symposium Series 504, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 214–225.

[١٩٤] Cohen, S.N. (1975) The manipulation of genes. *Sci. Am.*, **233,** 25–33.

[١٩٥] Swartz, J. (1996) *Escherichia coli* recombinant DNA technology, in *Esherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn (ed. F.C. Neidhardt), American Society of Microbiology Press, Washington, DC, pp. 1693–1771.

[١٩٦] Koehler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specifi city. *Nature*, **256,** 495–497.

[١٩٧] Riesenberg, D. and Guthke, R. (1999) High-cell density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51,** 422–430.

[١٩٨] Agathos, S.N. (1996) Insect cell bioreactors, in *Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects* (eds J.M. Vlak, C.D. de Gooijer, J. Tramper, and H.G. Miltenburger), Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 173–189.

[١٩٩] Carlsen, S. (1990) Molecular biotechnology in the research and production of recombinant enzymes, in *Industrial Use of Enzymes: Technical and Economic Barriers* (eds B. Wolnak and M. Scher), Bernard Wolnak and Associates, Chicago, pp. 52–69.

[٢٠٠] Cowan, D. (1996) Industrial enzyme technology. *Trends Biotechnol.*, **14,** 177–178.

[٢٠١] Van den Burg, B., Vriend, G., Veltman,O.R., Venema, G., and Eijsink, V.G.H. (1998) Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,**95,** 2056–2060.

[٢٠٢] Arnold, F.H. (1998) Design by directed evolution. *Acc. Chem. Res.*, **31,** 125–131.

[٢٠٣] Patten, P.A., Howard, R.J., and Stemmer, W.P. (1997) Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8,** 724–733.

[٢٠٤] Zhao, H., Chockalingam, K., and Chen, Z. (2002) Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13,** 104–110.

[٢٠٥] Yamada, H., Shimizu, S., and Kobayashi, M. (2001) Hydratases involved in nitrile conversion: screening, characterization and application. *Chem. Rec.*, **1,** 152–161.

[٢٠٦] Buckley, M.R. (2004) Systems microbiology: beyond microbial genomics, in *Report of the American Academy of Microbiology* (ed. M.R. Buckley), American Academy of Microbiology, Washington, DC, pp. 1–15.

obeikandl.com

الفصل الثاني

بيولوجيا الأنظمة الصناعية
INDUSTRIAL SYSTEMS BIOLOGY

خوزي مانويل أوتيرو و ينس نيلسين

José Manuel Otero and Jens Nielsen

(١ , ٢) المقدمة Introduction

تمر الصناعة الكيميائية في الوقت الحالي بتغيير جذري يقوده الطلب على أكثر العمليات استدامة لإنتاج الوقود، والكيماويات والمواد، ويعد هـذا نتيجة للقيود المالية والبيئية على حدٍ سواء. ولذلك فإن الصناعة تتطلع إلى استخدام عمليات التقنية الحيوية حيث تكون المواد الخام مواد نباتية متجددة، وذلك كبديل للعمليات الكيميائية التقليدية التي تعتمد على الـمواد الأولية النفطية. ويمكن استغلال الكائنات الدقيقة المختلفة فـي عمليات التقنية الحيوية، ولا سيما أن التنوع الكبير للتفاعلات الأيضية يمثل مصدراً غنياً لتصميم عمليات التحويل الكيميائية التي تؤدي إلى الإنتاج الكفء للمنتجات المرغوب فيها. ومع ذلك، كثيراً ما وجـد أن الكائنات الدقيقة التـي تنتج منتجاً مرغوباً فيه، إما بشكلٍ طبيعي وإما بسبب أنه تم هندستها وتصميمها من خلال إدخال مسارات مغايرة، تكون منخفـضة العائد والإنتاجية، وبغية إرساء عملية مناسبة اقتصادياً فمن الضروري تـحسين الأداء الإنتاجي للكائنات الدقيقة.

تعرف هندسة العمليات الأيضية بأنها تقنية التمكين. ويتم هندسة الشكل الأيضي للكائنات الدقيقة من خلال هندسة العمليات الأيضية بحيث يكون هناك تحويل فعال للمواد الأولية الخام، عادةً الجلوكوز، إلى المنتج المطلوب. وقد تشمل هذه العملية إدخال نشاطات إنزيمية جديدة أو حذف نشاطات إنزيمية حالية، ولكن في كثير من الأحيان أيضاً تغيير الهياكل التنظيمية القائمة التي تعمل في الخلية.

من أجل تحديد الإستراتيجية المثلى للهندسة الأيضية بطريقةً سريعة فإن الصناعة تبحث فـي مدى زيادة استخدام الوسائل والأدوات من بيولوجيا الأنظمة. ويشمل هـذا كلاً من تقنيات الأوميات "x-ome" مثل

الترانسكريبتوم، البروتيوم، والميتابولوم وتحليل التدفقات، وأدوات النمذجة الرياضية المتقدمة مثل النمذجة الأيضية على نطاق الجينوم (genome–scale metabolic modeling). وفي هذا الفصل نقوم بالبحث في تاريخ هذه التقنيات المختلفة واستعراض كيف تجد تطبيقات في مجال التقنية الحيوية الصناعية، الأمر الذي سيؤدي إلى ما نقوم بتعريفه هنا ببيولوجيا الأنظمة الصناعية.

(٢ , ٢) التقنية الحيوية الصناعية Industerial Biotechnology

ظهر مصطلح "التقنية الحيوية الصناعية" للمرة الأولى على نطاقٍ واسع في المراجع في أوائل الثمانينيات عندما كانت الهندسة الوراثية، مدفوعة بواسطة تقنية تعديل الحمض النووي، تبحث عن تطبيقات غير الرعاية الصحية والتقنية الحيوية الطبية [١، ٢]. وحالياً تمثل التقنية الحيوية الصناعية مجالاً معروفاً جيداً ذا حضورٍ أكاديمي وحكومي ومؤسسي. رسمياً، تعد التقنية الحيوية الصناعية هي التحويل الحيوي إما عن طريق التخمير الميكروبي وإما التحفيز الحيوي، للمواد الأولية العضوية المستخلصة من الكتلة الحيوية أو مشتقاتها إلى مواد كيميائية، مواد أخرى، و/أو طاقة. والكتلة الحيوية هي نتيجة تثبيت الكربون في عملية البناء الضوئي للنبات لتكوين البوليمرات العضوية التي قد تتحلل وتهضم إنزيمياً أو كيميائياً إلى كربوهيدرات، وبروتينات، ودهون أحادية. تهدف التقنية الحيوية الصناعية التي غالباً ما يشار في أوروبا إليها باسم التقنية الحيوية البيضاء [٣]، إلى توفير بدائل منافسة لعمليات البتروكيميات القائمة أو المقترحة من حيث التكلفة، وصديقة للبيئة، وذاتية الاكتفاء.

لقد كسبت العمليات التي تستغل التقنية الحيوية الصناعية اهتماماً عالمياً متزايداً مع الفحص الدقيق للعمليات البتروكيميائية التقليدية نتيجة زيادة تكلفة المواد الأولية الخام، والقيود البيئية، وانخفاض قدرة الاكتفاء الذاتي.

وشهدت التقنية الحيوية الصناعية نمواً غير مسبوق للعمليات القائمة على المصادر الحيوية التي تمثل ٥٪ من حجم المبيعات الكلي للإنتاج الكيميائي. بحلول عام ٢٠١٠م قدرت الكثير من الدراسات أن النسبة الكلية ستزيد إلى ٢٠٪ وهو ما يمثل ٣١٠ مليارات دولار أمريكي من حجم المبيعات الاجمالية المتوقعة وهو ١٦٠٠ مليار دولار أمريكي. سوف تستمر التقنية الحيوية الصناعية في الحصول على نسب مئوية كبيرة لحجم المبيعات في مجالات الكيماويات والسلع الاساسية (٢-١٥٪)، الكيماويات المتخصصة أو المواد الكيميائية ذات القيمة المضافة (٢-٢٠٪)، والبوليمرات (١-١٥٪). ومع ذلك، فإن أكبر نسبة من المكسب من المرجح أن تحدث في سوق الكيماويات الدقيقة (١٦-٦٠٪) حيث قامت منصات التقنية الحيوية الصناعية بتمكين الكيمياء المعقدة التي يتم إنتاجها حالياً عبر طرق تخليقية أو اندماجية معقدة [٤].

وعلاوة على ذلك، فإن التقنية الحيوية الصناعية تقوم بتمكين منتجات جديدة، خاصةً العوامل العلاجية الجديدة مثل البولي كيتيدات (polyketides) والكيماويات المتخصصة التي لم يسبق التعرف عليها مثل الأحماض الدهنية غير المشبعة المتنوعة و البوليمرات الحيوية المنتجة بواسطة الطحالب الدقيقة [٥].

إن التقنية الحيوية الصناعية ليست بأي حالٍ من الأحوال مجال جديد، وذلك مع عمليات التخمير الثابتة للمضادات الحيوية (إنتاج البنسيلين بواسطة بنيسيليوم كريزوجينوم؛ حجم السوق السنوي يتجاوز ١,٥مليار دولار أمريكي)، الفيتامينات (إنتاج حمض الاسكوربيك بواسطة عملية رايخشتاين والتحفيز الحيوي بواسطة الجلوكونوباكتر أوكسيدانس؛ حجم السوق السنوي يتجاوز ٦٠٠ مليون دولار أمريكي)، الأحماض العضوية (إنتاج حمض الستريك بواسطة أجناس الأسبرجلس؛ يتجاوز حجم السوق السنوي ١,٥ مليار دولار أمريكي)، والأحماض الأمينية (إنتاج إل-جلوتامات و إل-ليسين بواسطة كورينيباكتيريوم جلوتاميكوم؛ يتجاوز حجم الإنتاج السنوي ٦٠٠٠٠٠ الف طن) [٥].

فـي كل من هذه الأمثلة، تم عزل الكائنات المضيفة طبيعياً لتكون ملائمة لإنتاج المركب المطلوب. وبالإضافة إلى ذلك، فقد تم استخدام التطفير العشوائي تحت ظروف بيئية محكومة، متبوعاً بعملية الفحص، الاختيار، وتطوير العمليات الحيوية التقليدية لتحسين عائد الإنتاج، والتركيزات، والإنتاجية والثبات. علـى الرغم من أن هذه الطريقة فـي حقيقة الأمر لا تمدنا بشيءٍ يذكر من الـمعلومات لفهم الآلية أو الميكانيكية التي عن طريقها تؤدي الاضطرابات الوراثية الـمحددة إلـى سلالات محسنة بحيث يمكن ان تُستَغَل أكثر، فقد ثبت نجاحها تجارياً كما تم توضيحه بواسطة تحسين أكثر من ١٠٠٠-مرة في معدلات البنسيلين بواسطة بنيسيليوم كريزوجينوم [٦].

وتعزى الزيادات الكبيرة في مجال البحوث الأساسية والتنمية وتسويق عمليات التقنية الحيوية على النطاق الصناعي إلى عدة عوامل رئيسة والتي يمكن جمعها إلى أربعة عوامل واسعة النطاق من المهم أخذها في الاعتبار مرتبطة بتطوير العمليات الجديدة القائمة على المصادر الحيوية:

١- اقتصاديات العملية.

٢- تطوير عملية التقنية الحيوية.

٣- الأثر البيئي.

٤- الاستدامة والاكتفاء الذاتي.

ويتضمن كل من هذه العوامل واسعة النطاق عدة دوافع تعريفية وكمية تدعم تطبيقات التقنية الحيوية الصناعية إلى عمليات سابقة مقصورة على صناعة البتروكيماويات أو لإنتاج مواد كيميائية جديدة. ويوضح الشكل

رقم (١ , ٢) لمحة عامة عن مدى أخذ هذه العوامل الأربعة بالاعتبار وتقييمها قبل البدء في تطوير أي عملية تقنية حيوية صناعية.

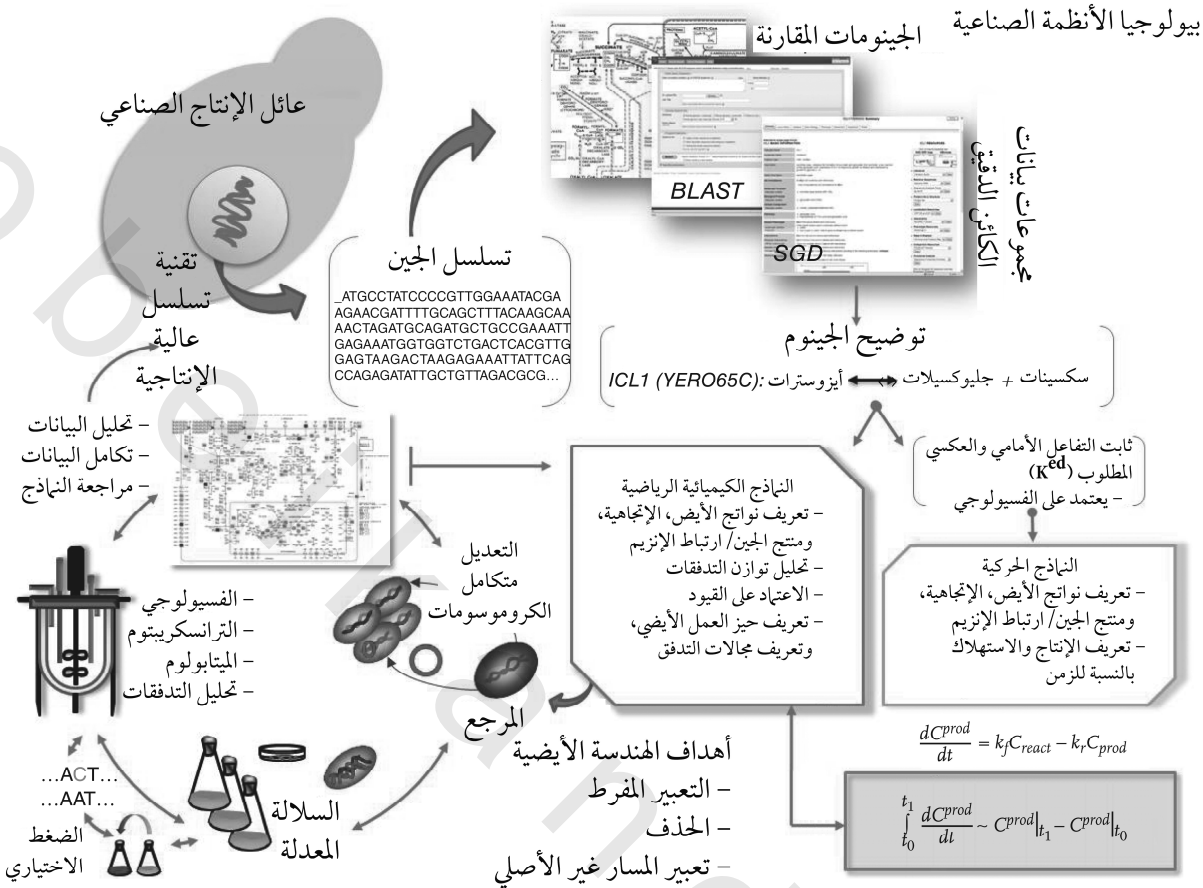
وقد تلقت التقنية الحيوية الصناعية في الآونة الأخيرة اهتماماً كبيراً وذلك بوصفها وسيلة لتطوير العمليات البتروكيميائية البديلة والتي تتميز بتكلفتها المناسبة، وجدواها التجارية، واستدامتها، واكتفائها الذاتي وتفضيلها بيئياً، وذلك مع زيادة أسعار النفط الخام خلال الفترة من يناير ٢٠٠٧م و ٢٠٠٨م حتى وصلت هذه الزيادة إلى ٢ , ٤١٪ [٧]. علاوةً على ذلك، فإنه بين عامي ١٩٩٧-٢٠٠٧م فقد شهد الغاز الطبيعي، وهو وسيط مشترك لإنتاج السلع الأساسية والكيماويات ذات القيمة المضافة، ارتفاعاً ملحوظاً في الأسعار بنسبة ٤ , ١٧٥٪ [٨]. يلخص الشكل رقم (١ , ٢) العوامل الأربعة الرئيسة التي غالباً ما يتم تقييمها عند النظر في استبدال عملية بتروكيميائية بعملية تقنية حيوية، أو تطبيقها لإنتاج مواد كيميائية جديدة. وتعد اقتصاديات العملية بالمقارنة بالمكافئات البتروكيميائية أو عمليات القياس الأخرى أمراً حاسماً وذلك في تحديد الجدوى التجارية مع التركيز بشكلٍ خاص على تكاليف التشغيل على المدى الطويل. وبعد ذلك يؤخذ في الاعتبار تكاليف تطوير التقنية الحيوية، والموارد، وجهود التنمية، وذلك بالتركيز على التحليل الأولي لإنشاء مبدأ إثبات صحة الفكرة على النطاق نصف الصناعي. وسوف يسلط هذا التقرير الضوء على وجه الخصوص على التأثير الذي كان للهندسة الأيضية وبيولوجيا الأنظمة على تطوير العمليات الأولية، مشيراً الى نموذج تغيير الطريقة والذي يشار إليه "ببيولوجيا الأنظمة الصناعية." ويشمل العاملان الأخيران الواجب تقييمهما الاستدامة والاكتفاء الذاتي، والأثر البيئي. لا ترتبط الاستدامة والاكتفاء الذاتي فقط باعتبارات محددة في سير العملية مثل توافر المواد الخام أو وجود فرص لمزيد من التوسع عن طريق تكامل المصافي الحيوية، ولكنها أيضاً تشمل التركيز على التصور العام وعلى المشهد الاجتماعي السياسي. ليس هناك شك في أن المحاولات الراهنة لضخ الجهود والموارد لعمليات التقنية الحيوية لن تكون ممكنة، حتى في ظل المناخ الاقتصادي الراهن، إذا لم تتواجد المبادرات المهمة الخاصة بالسياسات الحكومية، إضافةً إلى الدعم الاجتماعي واسع النطاق. ويلاحظ هذا أيضاً عند دراسة الأثر البيئي، ولاسيما في ضوء التأكيد العلمي الأخير على التغير المناخي العالمي الناتج من زيادة انبعاث الغازات الدفيئة [٩]. وسوف تحدد الدراسة الدقيقة لتلك العوامل الأربعة العامة ما إذا كان البدء في تنمية عملية التقنية الحيوية أمراً مضموناً أم لا. وفي حين أنه يكون من غير الواضح حالياً لمعظم علماء البحوث والتنمية أو المهندسين، فإنه من الضروري عدم تجاهل أثر تلك الاعتبارات الذي قد يلقي بظلاله على تنمية العملية، ولاسيما في تصميم إستراتيجيات لإنشاء مصنع خلايا ميكروبية. وإن هذا التحليل هو الذي يحدد العوائق والحدود والأهداف وإستراتيجيات الهندسة الأيضية المجدية، بما في ذلك التعرف على منهجيات أو طرق بيولوجيا الأنظمة التي يتعين استغلالها واستخدامها لتوضيح إثبات صحة تلك الفكرة عملياً.



الشكل رقم (١ , ٢). الدوافع الأربعة للتقنية الحيوية الصناعية.

ويهدف هذا الاستعراض إلى توضيح المنظور التاريخي لتطوير عملية التقنية الحيوية الصناعية، ولاسيما التركيز على التوزيع السريع للهندسة الأيضية وتقنيات بيولوجيا الأنظمة التي ظهرت لأول مرة بواسطة المجموعات البحثية الأكاديمية والتي كانت بدافع قطاعات صحة الإنسان وقطاعات التقنية الحيوية الطبية. وبوجهٍ خاص، ومن أجل التحفيز، فسوف يتم توضيح أمثلة للمنتجات الناضجة، وحديثة الإصدار وقيد التطوير والتي استفادت من أساليب التشغيل الجديدة المذكورة، أي بيولوجيا الأنظمة. واستناداً على تلك الأمثلة والعمليات الجديدة الموجودة قيد إثبات صحة الفكرة، فإننا هنا نعرف مصطلحاً جديداً وهو بيولوجيا الأنظمة الصناعية موضحين بأن الأدوات المحددة في مجال بيولوجيا الأنظمة الخاص المتنامي بسرعة هائلة والتي غالباً ما تنطبق على الهندسة الأيضية تنتشر في شكلين. تعيد الشركات هيكلة مجموعات تنمية العمليات الموجودة أو المتكونة بقدرات وخبرات بيولوجيا الأنظمة الصناعية، أو أنها تستعين بمصادر خارجية من أجل تنمية العمليات، وذلك للهيئات التي تم تأسيسها حديثاً والمتخصصة في بيولوجيا الأنظمة الصناعية.

ويقدم الشكل رقم (٢, ٢) عرضاً تخطيطياً مركزاً على أنظمة التقنية الحيوية الصناعية والمستوى المهم لدمج وتحليل البيانات المطلوبة لكي تؤدي في النهاية إلى عملية تجارية جيدة. إن بيولوجيا الأنظمة الصناعية هو تفاعل ديناميكي بين مختلف الأنظمة والأساليب. تعتمد تلك التقنية على عائل الإنتاج، الذي يتوفر له سلسلة الجينات الوراثية والتفسيرات التالية التي تعتمد على المراجع الحالية وقواعد البيانات إلى جانب علم الجينومات المقارن والبيانات التجريبية، إذا كانت متوفرة. وقد تختلف التفسيرات في أنواع بيانات علم الجينات الوظيفية المخصصة لمجالات محددة؛ ومع ذلك فعادةً ما يتم تطبيق هيكل تكويني معياري لتعريف الجين، ومنتج الجين (مثل إنزيم الأيض)، ونواتج الأيض التي تعمل كمتفاعلات والنواتج (بما في ذلك أية عوامل مساعدة أو مركبات وسيطة) والحركية الناتجة. وقد يمتلك هذا التوضيح الجينومي مجالات إضافية محددة مثل مستويات التعبير التي تم تحديدها بشكل تجريبي وتركيزات منتجات الأيض داخل وخارج الخلية، وقياسات التدفق المعتمدة على النظائر المشعة، ومستويات ترجمة البروتينات. ويمكن استخدام هذا الإطار المشار إليه على أنه إعادة هيكلة شبكات الأيض على المستوى الجينومي لإعداد النماذج الحركية أو الكيميائية الحيوية الكمية. ولأن عوامل الحركية مثل معدلات التفاعل الأمامية والعكسية تحت ظروف فسيولوجية معينة لم يتم تحديدها تجريبياً لقطاع كبير من تلك الشبكة، فإنه يتم استخدام تحليل توازن التدفق وذلك للنمذجة المتوقعة حيث إذ إنه يعتمد فقط على قيود الشبكات والمقياس الكيميائي الكمي (مثل التعريف الكيميائي الكمي للكتلة الحيوية، معدل الحفاظ على الـ ATP ومعدل استيعاب للجولوكوز).



الشكل رقم (٢ , ٢). بيولوجيا الأنظمة الصناعية.

تسمح هذه النمذجة بوجود وظيفتين أساسيتين لمهندسي الأيض ويجب أن يتم إنجازهما. أولاً، فهي تكون أرشيف هيكلي للأيض الميكروبي الذي قد يتم فحصه واستبيانه وتعظيمه من خلال العروض المرئية، ثانياً، هي تقدم إطاراً للمحفزات المتوقعة في ظل قيود معينة مما يساعد على تضييق إستراتيجيات الهندسة الأيضية التي يتم دراستها، والتي تكون قائمة في أغلب الأحيان على معرفة المسارات الكيميائية الحيوية الكلاسيكية أو الإستراتيجيات الجديدة التي تنشأ من نتائج المحاكاه. وعند تحديد درجة إستراتيجية هندسة أيضية عالية الاحتمال ناجحة، التي تتطلب عادةً معدل مفرط في التعبير الجيني، والحذف أو إعادة هيكلة المسار غير الأصلي، فإنه يتم إجراء الهندسة الوراثية على عائل الإنتاج مؤدية إلى سلالة معدلة. ويتم توصيف السلالة المعدلة مبدئياً، وقد تمر بعملية تطور موجه أو أية طرق أخرى غير مستهدفة؛ وذلك لكي تنتج تركيب ظاهري متطور. ويتم توصيف السلالة المعدلة الناتجة تحت ظروف تخمير جيدة التحكم، حيث يتم تحديد العوامل الفسيولوجية مثل معدل النمو الخاص الأقصى، معدلات استهلاك وسط التفاعل، وعائد وتركيزات

المنتج، وتكوين المنتجات الثانوية والشكل الظاهري. وبالإضافة إلى ذلك يتم استكمال توصيف الجينومات الوظيفية، الذي يتطلب عادةً قياسات الترانسكريبتوم والبروتيوم والميتابولوم والتدفقات. وهنا تكون المعلومات الحيوية مع تكامل البيانات مطلوبة لتحليل السلالة المعدلة الناتجة، ولتحديد فرص الجولة الثانية من الهندسة الأيضية.

وبالإضافة إلى ذلك فإنه يتعين أن يؤدي التحليل إلى نموذج مراجع ذو قوة توقع مطورة تؤدي إلى إستراتيجيات واعدة لتطوير النمط الظاهري بشكلٍ أكبر. بينما يتم الإشارة إلى ذلك المنهج عادةً بدورة الهندسة الأيضية، فإننا هنا نفضل الدورة التقليدية لتشمل الطرق المتكاملة ومجموعات البيانات من بيولوجيا الأنظمة. وعند تطبيقها لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية فإنه يشار إليها باسم بيولوجيا الأنظمة الصناعية.

سوف تقدم الأجزاء التالية عرضاً موجزاً لما يلي: (١) دوافع الأسواق للتقنية الحيوية الصناعية، (٢) بيولوجيا الأنظمة الصناعية. سوف تركز الأجزاء التالية على استكشاف بيولوجيا الأنظمة الصناعية من منظور نمذجة الأيض الميكروبي، ولاسيما عند تقديم دراسات الحالة لمختلف المنتجات التي انتفعت بشكل كبير من الاكتشافات الهائلة في الهندسة الأيضية ومن بيولوجيا الأنظمة.

(٢ , ٣) دوافع السوق للتقنية الحيوية الصناعية Market Drivers for Industrial Biotechnology

ترتبط العوامل الأربعة المشار إليها في الشكل رقم (١ , ٢) ببعضها بعضاً بشكل كبير، وهناك جدل كبير فيما يتعلق بتصنيف تلك العوامل من حيث الأولوية والتأثير. يتم عادة تقدير اقتصاديات العملية بإعداد النماذج الكمية التي تشمل تكاليف العمليات الرئيسة، التشغيلية والرأسمالية، و قيمة العملية المخصصة من قبل سعر السوق المقدر للمنتج، ومعدل زيادة الطلب، ونصيب السوق وأية ميزات تنافسية قد توجد. وبالنسبة للترويج التجاري فإنه من المناسب أن نفترض أن اقتصاديات العملية يجب أن تكون مفضلة قبل الاستمرار في أي محاولة عند دراسة تطوير عمليات التقنية الحيوية واستدامتها أو أثرها البيئي (انظر الشكل رقم ١ , ٢).

إن الاستدامة والاكتفاء الذاتي قد يكونا أقل تعريفاً، مع ملاحظة أن الكثير من الأمور المأخوذة في الاعتبار، بما في ذلك وفرة المواد الخام واحتمال تكامل العمليات إلى مصفاة حيوية، قد يتم مناقشتها في اطار اقتصاديات العملية. وهي مدرجه في الشكل رقم (١ , ٢) ويتم مناقشتها كفئة منفصلة؛ وذلك بسبب التركيز الأخير الذي تلقته في ضوء زيادة أسعار البترول والمواد الخام. ويمكن للاكتفاء الذاتي والاستدامة أن يعملا على دعم اقتصاديات العملية في الحالات التي تؤدي فيها موضوعات مثل الأمن القومي دوراً مهماً (مثل الاعتماد على دولة أجنبية من أجل الحصول على نسب كبيرة من الطاقة).

في حين يبدو من غير المنطقي مناقشة دوافع السوق من خلال فصل يركز على التطور في الهندسة الأيضية وبيولوجيا الأنظمة اللذان يوضحا الأيض الميكروبي مما مكن من استغلالها، فإنها تعد في حقيقة الأمر من بين الخصائص التي تميز التقنية الحيوية الصناعية عن أية أنظمة أخرى. وسوف توجه دوافع السوق، والفهم الواضح لأثرها بشكلٍ كبير أي إستراتيجية هندسة أيضية يتم تفضيلها، وعليه تدفع البحث والتطوير. فعلى سبيل المثال فإن اختيار المواد الأولية المناسبة مثل الجلوكوز والزيلوز أو الجليسرين، أو المواد الأولية المعقدة مثل الليجنوسيليولوز لعملية تقنية حيوية صناعية سوف يحدد اختيار إستراتيجية الهندسة الأيضية، وعليه يحدد أدوات بيولوجيا الأنظمة التي يتم استخدامها. وبالتأكيد فإن اختيار المواد الأولية يرتبط بشكل وثيق بالقطاعات التي تم إيضاحها في الشكل رقم (١ , ٢).

وقد تم تقديم مثال أكثر واقعية في مرجع أخير للأثر الذي قد يكون للوقود الحيوي وتحديداً الإيثانول الحيوي على مجال التقنية الحيوية الصناعية. وهو يوفر سياقاً وعلاقة واضحة بين دوافع السوق وبين الإنجازات المهمة التالية في بيولوجيا الأنظمة الصناعية وأثرها في تطوير العمليات [١٠].

(٤ , ٢) بيولوجيا الأنظمة الصناعية Industrial Systems Biology

إن بيولوجيا الأنظمة هي الجمع الكمي والتحليل والدمج لكافة مجموعات البيانات التي تمكن من إجراء وإعداد النماذج الرياضية التوقعية. ومع إتاحة تسلسلات الجينات لكائنات الإنتاج، فإن تطوير العمليات كان العامل الأساسي للإنجازات العلمية في بيولوجيا الأنظمة، ولاسيما في مجالات الترانسكريبتومات، والبروتيومات، والميتابولومات، والفلوكسومات. وتشمل تلك التطورات حالياً صندوق أدوات بيولوجيا الأنظمة الذي يمكن استغلاله أكثر لإنتاج نواتج الأيض الثانوية التي قد تستخدم كمرادات في القطاع البتروكيميائي. وبمعلومية التعريفات الكثيرة والتسميات الواسعة التي تطورت في بيولوجيا الأنظمة، فقد أعطى قاموس لمصطلحات الأوميات في الجدول رقم (١ , ٢)، وسيتم استخدام هذه التعريفات هنا.

وسوف تركز الأمثلة التي سيتم مناقشتها هنا بشكلٍ كبير على تطوير العمليات الأولية، مع الاهتمام الخاص بإستراتيجية الهندسة الأيضية المستخدمة، وكيف يوفر تحليل وبيانات الجينات الوظيفية مميزات واضحة. وسوف تحدد الأمثلة المذكورة بعض الأمثلة من كائنات التخمير الكثيرة، مع التركيز على خميرة السكارواميسيس سيرفيسي.

وسيكون من المدهش معرفة أن منتج التقنية الحيوية الصناعية الأضخم في العالم، الذي يكسب دعماً مؤسسياً واجتماعياً وحكومياً غير مسبوق هو الإيثانول الحيوي. في عام ٢٠٠٥م بلغ إجمالي الإنتاج العالمي من الإيثانول الحيوي ٤٦ مليار لتر، مع زيادة حجم إنتاج وإجمالي عدد معامل التكرير التي تم إنشاؤها ما بين عامي ٢٠٠٥- ٢٠٠٦م في الولايات المتحدة الأمريكية بمقدار ٦ , ٢ مليار لتر و١٤، على التوالي [١١].

الجدول رقم (١ , ٢). قاموس مصطلحات الأوميات (X-omic).

بيولوجيا الأنظمة	طريقة متعددة الأنظمة تعتمد على تكامل واستجواب الأنواع المختلفة من البيانات التي تساهم في الدعم المشترك على أساس علم الجينوم وخصائص علم الجينوم الوظيفي للنظام الحيوي مع التركيز المعين على تطوير الأساليب الرياضية التوقعية والكمية.
الهندسة الأيضية	مجال يشمل كل من الهندسة الأيضية الأمامية والعكسية. الهندسة الأيضية هي المنهج العقلاني والكمي الموجه عن طريق الجينات لإعادة توجيه تدفقات الأيض لتطوير العائد، والتركيز، والإنتاجية، و/ أو الثبات المرتبط بمنتج أيض محدد في النظام الحيوي.
بيولوجيا الأنظمة الصناعية	تطبيق أساليب تجريبية أو رقمية يتم تطويرها نتيجة التحليل الفردي أو الجماعي للأوميات وذلك لتطوير العملية الحيوية. ويشمل تطوير العملية الحيوية تحسينات السلالة أو نظام التعبير من حيث تركيز المنتج النهائي، والعائد، والإنتاجية أو التحسينات في قوة وفاعلية العمليات.
الهندسة الأيضية الأمامية	هذه هي هندسة أيضية مستهدفة تمثل التقدم الخطي من النمذجة إلى تحديد الجين المستهدف لتركيب وتوصيف السلالة. وتتضمن هذه الإستراتيجية التعديل الوراثي المتخصص والقائم على النظريات، والذي يعتمد على النمذجة الأيضية التوقعية، من توازن حركيات المسار الكيميائي الحيوي البسيط إلى نماذج الحركيات الأكثر تعقيداً.
الهندسة الأيضية العكسية	يتم فحص سلالة العائل المكونة بواسطة الطفرات الموجهة أو العشوائية و/ أو التطور من خلال أدوات علم بيولوجيا الأنظمة لتحديد التغيرات الوراثية التي تؤدي إلى النمط الظاهري المطلوب.
الأوميات	مصطلح عام يشير إلى جمع وتحليل أية مجموعة بيانات عالمية والذي يتم بواسطته بحث أي نوع من مسارات المعلومات بالعودة إلى جينوم الخلية. ويتطلب تحليل الأوميات وجمع البيانات كامل التسلسل الوراثي للخلية.
علم الجينوم	الدراسة الشاملة للتفاعلات والديناميكيات الوظيفية لجميع مجموعات الجينات ومنتجاتها، عادةً تعتمد على الفصيلة والسلالة.
علم الترانسكريبتومات	دراسة الجينوم الواسعة لمستويات تعبير الحمض النووي الريبوزي الرسول mRNA في خلية حيوية واحدة أو مجموعة منها لمجموعة معينة من الظروف البيئية المحددة.
علم الميتابولومات	قياس منتجات الأيض لتقييم الاستجابة الأيضية الكاملة لكائن لمحفز بيئي أو تعديل وراثي. ويعرف منتج الأيض هنا بأنه أي وسط تفاعل أو منتج يشارك في تفاعل يتم تحفيزه بواسطة أي منتج جيني.
علم الفلوكسومات	دراسة المجموعة الكاملة من التدفقات التي يتم قياسها أو حسابها في شبكة تفاعل أيضي معينة. ويعرف تدفق الأيض بالقياس الكمي لمعدل تحويل المتفاعلات إلى المنتجات، بينما يمكن تعريف المعدل بأنه هو الكتلة أو التركيز لكل وحدة زمنية لاستهلاك المتفاعلات وتكوين المنتج.
علم البروتيومات	التحليل على المستوى الكبير لتركيب ووظيفة البروتينات وكذلك تفاعلات البروتينات مع بعضها في الخلية.
علم الميتاجينومات	دراسة الجينومات والأوميات المرتبطة في الكائنات التي يتم استعادتها من البيئة في مقابل الزراعات المعملية. وعادة ما يصعب زراعة الكائنات المستعادة من البيئة في الظروف المعملية المحكومة، ولكن يمكن أن تظهر خصائص مهمة التي يمكن الحصول عليها من خلال علم الجينوم الوظيفي.

إن السكارواميسيس سيرفيسي حالياً هي المنتج المفضل للإيثانول الحيوي، من بين منتجات التقنية الحيوية الصناعية الأخرى، وذلك نتيجة ثبات العملية الصناعية وتوصيف الأوميات الفسيولوجي غير العادي [١٢-١٥]. وقد أتيح تسلسل جينوم السكارواميسيس سيرفيسي الذي يتكون من ٦٦٠٤ هياكل قراءة مفتوحة (٤٤٣٧ مؤكدة؛ ١٣٤٣ بدون توصيف؛ و٨٣٤ غير محددة المعالم) [١٦] للجمهور في عام ١٩٩٦م بواسطة أندرو جوفوي من الجمعية الأوروبية لبحوث الخمائر [١٧]. وبعد ذلك في عام ١٩٩٧-١٩٩٨م، تم تقديم مجموعة الدنا الحلقي المصغرة التي تستكشف تنظيم الجين الأيضي وبيانات المجموعة المصغرة للمنصة التجارية الأولى (Affymetrix) التي تقوم باستكشاف تنظيم الخلايا التفتلية [١٨، ١٩].

وقد مكَّن تسلسل الجينوم مع الشرح المكثف على أساس الكيمياء الحيوية، والمراجع والبيانات المتاحة من نشر نموذج الأيض الأول على مستوى الجينوم لخميرة السكارواميسيس سيرفيسي في عام ٢٠٠٣م [٢٠]. ويمثل هذا النموذج دمجاً لكميات كبيرة من البيانات في صيغة موحدة ومحددة مما يسمح بمحاكاة الطرز الجينية التي تم هندستها وذلك للحصول على الطرز الظاهرية المرغوب فيها [٢٠، ٢١].

وقد ساد تطوير السلالات عن طريق التطفيرات العشوائية لعائل الإنتاج، بواسطة المطفرات الكيميائية والإشعاع، يتبعه بعد ذلك الفحص والاختيار في بيئات محكومة من أجل الحصول على النمط الظاهري المرغوب فيه. وعلى الرغم من أن هذه المنهجية كانت ناجحة بشكل كبير، إلا أنها كانت مدفوعة بالمنتج النهائي بصورةٍ كبيرة مع فهم ميكانيكي بسيط. وحالياً، ومع الزيادة التصاعدية في تسلسلات الجينوم لعوائل الإنتاج الحالية والمستقبلية، إلى جانب أدوات المعلومات الحيوية التي تمكن من دمج مجموعات بيانات الأوميات، فإنه يمكن تحديد الإستراتيجيات الوراثية المستهدفة عالية الحدوث لزيادة العائد والتركيز والإنتاجية و/ أو الثبات [٢٢-٢٤]. ومن الممكن الآن إجراء هندسة أيضية عكسية، حيث يتم توصيف أنظمة الإنتاج الناجحة سابقاً أومياً لتوضيح مسارات أيض أساسية ونقاط تحكم للجولات المستقبلية للهندسة الأيضية المستهدفة [٢٥]. وفي كلٍ من الهندسة الأيضية العكسية والأمامية، فإن نماذج مستوى الأنظمة تعمل على تسريع عملية تطوير العمليات القائمة على المصادر الحيوية، مما يؤدي إلى خفض المدة الزمنية حتى يتم الترويج لها في حيز ضيق.

وحالياً فإن علماء التقنية الحيوية الصناعية لم يعودوا يفكرون في المنتجات الفردية، ولكنهم يقومون بدراسة المجموعات المتنوعة من السلع البتروكيماوية، والكيماويات ذات القيمة المضافة، وذات القيمة المضافة العالية، والكيماويات المتخصصة لإنتاجها باستخدام التقنية الحيوية. وقد استخدم مصطلح المصافي الحيوية لأول مرة في عام ١٩٩٩م، عندما تم الاقتراح أن تحويل المواد الخام اللجنوسليولوزية إلى عدة سلع حيوية بواسطة عمليات وحدة متكاملة قد يقدم أداءً تنافسياً لمعامل التكرير البتروكيماوية الحالية [٢٦].

وفي حالة نشأة نموذج معمل التكرير الحيوي (المصفاة الحيوية) من التصور الأكاديمي إلى الواقع الصناعي فإنه يتطلب عاملين دافعين أساسيين: أولاً: يتعين أن تستمر المظاهر والمعالم الاقتصادية والسياسية الاجتماعية في دعم الاستثمار المالي وضمانه، والسياسة القانونية المفضلة، والطلب المدفوع من قبل المستهلك. ثانياً: يجب أن يتم تطبيق التطورات والأدوات التي تم تطويرها داخل بيولوجيا الأنظمة للهندسة الأيضية (التمثيل الغذائي) بنجاح في البيئات التجارية. وقد اقترحت أمثلة عديدة مثل الإيثانول الحيوي أن المصافي الحيوية تكون مناسبة تجارياً؛ إلا أن مسارات المنتجات المتنوعة المطلوبة تستمر في حاجتها لأساليب هندسة أيضية أكثر تعقيداً ومتعددة الجينات الأصلية وغير الأصلية. ويمكن فقط تحقيق هذه الأساليب من خلال الدمج والتكامل المتقدم لمجال الأيض الميكروبي باستخدام أدوات بيولوجيا الأنظمة.

(٢ ,٥) نماذج الأيض Metabolic Models

(١ ,٥ ,٢) الأيض الميكروبي – منظور تاريخي Microbial Metabolism–A Historical Perspective

كانت هناك استعراضات مكثفة حول تطبيق التطفيرات العشوائية والتطور الموجه للتنمية الجديدة أو تحسين مصانع الخلايا الميكروبية الحالية لإنتاج سلسلة هائلة من منتجات التقنية الحيوية الصناعية [٢٧-٣٢]. ويعتمد ما يشار إليه عادةً بتحسين السلالات الكلاسيكي على قدرة تحفيز ودعم التنوع الوراثي، تحت ظروف معملية محكومة، في عائل إنتاج معين والذي يمكن فحصه وفصله وزراعته والاحتفاظ به على أساس معايير النمط الظاهري. ويمكن تحفيز التنوع الوراثي باستخدام العوامل الكيميائية المطفرة، والإشعاع والتعرض للضوء فوق البنفسجي وعوامل الإدخال أو خلال التعديل الوراثي [٢٧]. وبينما قد يحدث توصيف فسيولوجي للسلالات المعدلة الناتجة بعد ذلك، فإن التحولات والتغيرات الوراثية النوعية والمستهدفة التي أدت إلى تحسين النمط الظاهري تكون غير معروفة، مما يحول دون تطبيق الفهم الميكانيكي في البحوث المستقبلية الخاصة بتطوير السلالات.

وقد تم توصيف الأيض الميكروبي، وهو مجال عمل الهندسة الأيضية الحديثة، وإنشاء معرفة علمية ما يقارب من قرن؛ ومع ذلك، ففي حالة تحديد خط زمني فإن عام ١٩٣٢م قد يكون هو البداية والانطلاقة حيث إذ إنه يتزامن مع نشر الأستاذ ألبر جان كلوفير (١٨٨٨-١٩٥٦م) في مجلة العلوم لبحثه "الأيض الميكروبي وتأثيره على مشكلة السرطان" [٣٣]. ومثل تقنية الحامض النووي المعدلة التي تم تطويرها في أوائل السبعينيات في جامعة ستانفورد وجامعة كاليفورنيا في سانفرانسيسكو [٣٤]، فإن التطبيقات الأولى للأيض الميكروبي ارتبطت بصحة الإنسان والدواء. وأيضاً في عام ١٩٣٢م وقبل نشر مقالة كلوفير بخمسة أشهر، عرضت مقالة أخرى أحد الأمثلة الأولى للدور الذي يلعبه الأيض الميكروبي في التقنية الحيوية الصناعية، والتي تلقت حينها القليل من الانتباه. وظهرت هذه

المقالة بواسطة بولي وجريفز بعنوان "تطبيق منحنى النمو الذاتي التحفيزي على الأيض الميكروبي" في مجلة علم البكتيريا [٣٥]. وقد قدَّم المؤلفون في مقالة من ٢٢ صفحة مع أربعة مراجع ملحوظتين أساسيتين، الملحوظة الأولى بسيطة، ومع ذلك توضح علم حركية النمو الميكروبي والتي تم تلخيصها بدقة في الفقرة الافتتاحية التالية:

لا يحدث النمو بمعدل ثابت في الكائنات الحية. ويكون بطيئاً تصاعدياً في الزراعات البكتيرية في أول الأمر، ثم تزيد سرعته، وبعد ذلك يكون بطيئاً تنازلياً بشكل استثنائي. ويكون هذا نتيجة وجود الباديء الأساسي في البيئة الجديدة بكمية صغيرة. وقد وجدنا بالمثل أن معدل تراكم منتجات الأيض الميكروبي ليست ثابتة ولكنها تبدأ بشكل بطيء وتزداد بسرعة ثم تعود للبطء مرة أخرى [٣٥].



الشكل رقم (٣,٢). الأيض الميكروبي.

إن الملاحظة الثانية هي إمكانية حدوث منهج متعدد الأساليب حيث يمكن استخدام تطبيق معادلات التفاعل الحركي المختلفة، التي تم تطبيقها أولاً للتفاعلات الكيميائية ذاتية التحفيز أحادية الجزيئات وبعد ذلك لنمو النباتات والحيوانات [٣٦]، لملاءمة بيانات تراكم ثاني أكسيد الكربون والنترات في بكتيريا التربة وفي السكاروميسيس سيرفيسي، على التوالي [٣٥]. وهذا هو المثال الأول الواضح لاستخدام النماذج الرياضية لملاءمة

بيانات الأيض الميكروبي الحالية، ومن ثمَّ يؤدي إلى علاقة توقعية بين تراكم منتجات الأيض (مثل النترات وثاني أكسيد الكربون) والزمن، عن طريق ثابت معدل التفاعل (الشكل رقم ٢,٣). وقد تم بحث الأيض الميكروبي بشكل مكثف منذ الثلاثينيات، عندما تم تطبيق عبارات معدل التفاعل الكلاسيكية لوصف كيمياء التفاعل ذاتية التحفيز لتكوين ثاني أكسيد الكربون في السكارروميسيس سيرفيسي. ويتطلب هذا النهج مظاهر تركيز المنتج كدالة في الزمن، والتركيز الأولي للمنتج لتحديد ثابت معدل التفاعل. وكان هذ هو أسلوب ملاءمة البيانات مع تركيز بسيط على قوة التوقع؛ ومع ذلك، فإنه استكشف بشكل شبه كمي العلاقة بين استهلاك منتج الأيض ومعدلات الإنتاج فيما يتعلق بمعدل النمو [٣٥]. وفي العشرين عاماً التالية تم تطوير التقدم الهائل المحرز في توضيح تحليل الجلوكوز ودورة حمض الستريك وأكسدة الأحماض الدهنية وحركية النمو والعلاقة بين معدل النمو ومعدل استهلاك وسط التفاعل ومعدل تكوين المنتج. وقد اعتمدت هذه الطريقة على توازن الكتل الكلاسيكية مع التأكيد على تحديد العوامل الحركية. ومن الستينيات فصاعداً فقد امتد نهج وصف الأيض مع توازن الكتل وتقدير عوامل الحركية بشكلٍ كبير ليشمل الغالبية العظمى من مجال الأيض (الشكل رقم ٢,٣ب). وكان نشر المسارات الكيميائية الحيوية التي وفرت التمثيل المرئي الأول لمكونات الأيض الأساسية معلماً أساسياً. ويوجد أكثر من ١٠٠٠ تفاعل يتم تحفيزه بواسطة الإنزيمات تم تقديمها بالشرح المحدد وموجودة في الطبعة الرابعة من المسارات الكيميائية الحيوية الأخيرة بما في ذلك المقاييس الكيميائية الكمية والهيكل الكيميائي وارتباط المسارات والتقسيم وإذا أمكن التنظيم [٣٧]. وقد سمحت الشبكة الميكروبية المعاد هيكلتها، والمتوفرة خاصةً في أشكال تصويرية فردية، بإخراج الجيل الأول من إستراتيجيات الهندسة الأيضية التي يتم ابتكارها على أساس الإستراتيجيات القائمة على الافتراضات.

وعلى الرغم من أنه عادةً يذكر الفضل لجاك مونود على أنه هو المسئول عن التوصيف الرياضي الحديث لحركية النمو، غالباً ما يشار إليه باسم "حركية النمو لمونود"، والتي تشمل علاقة الحركية لتكوين الكتلة الحيوية كدالة لتركيز وسط التفاعل والانجذابية التي تنشأ من عمله القوي على حركية الإنزيم باستخدام بيتا-جالاكتوسيديز في إيشيريشيا القولون، كما تم تلخيصه في سلسلة من الأبحاث التي كان آخرها البحث المنشور من مجلة الطبيعة في عام ١٩٥٣م [٣٨]، إلا أن بولي وزملاءه وذلك قبل عشرين عاماً كانوا هم الذين قيموا علاقات الأيض الميكروبي والتي قد تستخدم كأسس للتخميرات الصناعية الأولى. وخلال الفترة نفسها فقد قام علماء آخرون، بما فيهم مايرهوف [٣٨-٤٥]، وإمبدن [٤٦]، وبارناس [٤٧]، وفاربورج [٤٨، ٤٩]، وكوري [٥٠-٥٢]، وهاردن [٥٣-٥٧]، ونويبرج [٥٨]، بشرح مسارات الأيض ولاسيما المرتبطة بالتخمير اللاهوائي، وأيضاً مع التركيز الخاص على التطبيقات الطبية.

وخلال الفترة نفسها عمل هانز كريبس على المكونات الأساسية لأيض الكربون المركزي، مثل أيض الأحماض الأمينية، (مثل حمض الجلوماتيك والبرولين)، ودورة حمض الستريك، المشار إليها حالياً بدورة كريبس [٥٩-٧٠]، مؤكداً قابلية الخلية للأيض الهوائي وأكسدة نواتج الأيض. ومن الجدير بالملاحظة أن خميرة الخباز أدت دوراً أساسياً في متابعة خط البحث هذا، عندما تم استخدام التعليم بالخلات المحتوية على نظائر الكربون c^{14} وملاحظة أن الأحماض ثنائية الكربوكسيل مازالت غير معلمة، مما وضح وجود نماذج مختلفة للتخمير والأكسدة تنتج من مختلف أنواع مصادر الكربون المستخدمة [٦٩]. وعلى عدة أوجه أخرى، يمكن للمرء أن يجادل بأن هذا كان هو بداية قياسات تدفق الأيض في تحديد المسارات. (ملاحظة: إن التعليم بالنظائر المشعة كان واسع الاستخدام في الأربعينيات لدراسة توزيع ذرات الكربون في الأحماض الدهنية وخلات الخليك التي ثبت وجودها في دورة حمض الستريك. وقد ثبت بعد ذلك أن الأحماض ثنائية الكربوكسيل تكون وسيطة في الأكسدة الكاملة للأحماض الدهنية [٧٠]). وقد حصل كريبس على جائزة نوبل في الفسيولوجي في عام ١٩٥٣م مشاركة مع فريتز ليبمان (يرجع إليه الفضل لاكتشاف العامل المساعد للإنزيم أ)؛ بسبب توضيحهما لأيض المركبات الوسيطة. وفي حين أن التركيز مازال على الصحة البشرية، فقد أشار كريبس في خطاب حصوله على الجائزة إلى المناقشة المتعلقة بأكسدة الخلات وعلاقتها بدورة حمض الستريك.

> قد يكون حقيقياً أنه قد لا ينظر إلى هذه النتائج كنتائج جامعة بسبب وجود عوائق النفاذية التي قد تحول دون خلط المواد الناتجة من المركبات الوسيطة مع هذه الموجودة في الأقسام الأخرى من الخلية، وفي الوقت الحالي فإنه من الأفضل اعتبار مسار الأكسدة النهائي في الخميرة وبعض الكائنات الحية الدقيقة الأخرى مثل إيشيريشيا القولون كمشكلة مفتوحة، وذلك على الرغم من حدوث تفاعلات الدورة في تلك المواد [٦٨].

وعند ذلك، فقد تم بالفعل تقييم خميرة الخباز وإيشيريشيا القولون، الذين يعدا اثنين من أهم عوائل التقنية الحيوية الصناعية الرائدة، ككائنات نموذجية، وقد تم ملاحظة أحد السمات المميزة الأساسية لتلك الكائنات التي تؤثر حتى الآن في إستراتيجيات الهندسة الأيضية: وهو تقسيم الخلية.

ويمكن استكمال تتبع أسس الأيض الميكروبي الحديث خلال المراجع، ولكن تعتزم المجموعة الفرعية الصغيرة من الأمثلة المقدمة هنا تقديم المنظور والسياق لعمليات التقنية الصناعية الأولى. وقبل تطوير تقنية الحامض النووي المعدل، فقد كان هناك تطورٌ أساسيٌ في مراجع الأيض التي تستمر حتى يومنا هذا في التأثير على الهندسة الأيضية وعلى طرق بيولوجيا الأنظمة؛ ومع ذلك، لم يتم مناقشتها في هذا السياق. وفي عام ١٩٦٥م تم نشر الطبعة الأولى من كتاب المسارات الكيميائية الحيوية بواسطة شركة بورنجر مانهيم المتحدة (مانهايم، ألمانيا)، التي أنشئت بواسطة د. جيرهارد ميشال. وكان هذا هو أول تمثيل مصور ومرئي وشامل للأيض، والذي كان مبدئياً

على شكل رسم مخططات جدارية (الشكل رقم ٣, ٢) ولكن تم تحويله مؤخراً إلى صيغة كتاب [٣٧]. (ملاحظة: أنه مع هذا الكتاب يوجد أربع طبعات من مخططات المسارات الكيميائية الحيوية، شاملة الكتاب المرجعي، المسارات الكيميائية الحيوية، المنشور عام ٢٠٠٥م، والتي يستمر تحريرها بواسطة د. جيرهارد ميشال. ويمكن الحصول على المخططات الجدارية من شركة روش للتشخيص المتحدة (مانهايم، ألمانيا) من الموقع http//www.roche-applied-science.com/techresources/publications_req.jsp). وقد تم لأول مرة جمع هذا الدمج من البيانات الحيوية، الذي اشتمل على العلاقات الكيميائية الكمية، والهيكل الكيميائي لكافة المتفاعلات، والنواتج والمركبات الوسيطة والعوامل المساعدة وتخصيص الإنزيمات لتفاعلات خاصة، وتحديد التقسيمات والنقل، وإن أمكن البيانات التنظيمية أو التفاعلات، في مسارات مركزية مثل تحليل الجلوكوز، ودورة حمض الستريك، وتخليق وتحليل الأحماض الدهنية، والأحماض الأمينية والنيكليوتيدات. وقد وفرت بصورةٍ أهم أحد التمثيلات العالمية المرئية الأولى لشبكة الأيض المعاد هيكلتها، حيث يمكن تحديد الارتباط بين نواتج الأيض والمسارات والتقسيمات. ويسمح التمثيل النظامي المرئي لشبكات الأيض بتطوير أساليب هندسة أيضية بديهية على أساس الافتراض استناداً على تدفق الكربون في اتجاهات معينة أو إعادة توجيه تدفقات أيض أخرى في الاتجاهات المرجوة. وقد ترددت خريطة الأيض هذه على جدران كل المراكز البحثية الأكاديمية والصناعية الأساسية للتقنية الحيوية الصناعية، وزودت مهندسي الأيض بعرض شامل للمظاهر التي تعمل من خلالها تلك التقنية.

وبالطبع كان الجزء الأساسي المفقود من المعلومات هو العلاقة بين الجينات ومنتجات الجينات (مثل الإنزيمات الوظيفية)، ومسارات الأيض التي تعمل عليها. وبالإضافة إلى ذلك، فإن مخططات جدران المسارات الكيميائية الحيوية، في حين تطورت لتشمل تفاصيل خاصة بالكائن الحي، قد تم معاملتها على أنها ملخص لكافة التفاعلات الأيضية في مختلف الكائنات التي تمت دراستها. ومرةً أخرى، فقد يوفر علم الجينوم المقارن؛ بالإضافة إلى جهود المعلومات الحيوية لإيجاد قواعد بيانات تركز على الكائن التخصصية المطلوبة.

(٢, ٥, ٢) تسلسل الجينوم وعلم الجينوم الوظيفي Genome Sequencing and Functional Genomics

لقد وفرت مراجع عديدة المنظورات التاريخية المتعلقة بتكوين المجال متعدد الاختصاصات لبيولوجيا الأنظمة، وأثره في الهندسة الأيضية أو بشكلٍ أشمل على التقنية الحيوية الصناعية، والتي غالباً ما تركز على مراجع الاكتشافات المهمة [٧١-٧٥]. وكان الأسلوب التكميلي الأكثر تركيزاً على توضيح ما إذا كانت تلك الاكتشافات المهمة حاسمة للترويج التجاري للتقنية الحيوية الصناعية أم لا، هو دراسة مراجع براءات الاختراع التي تعمل بجانب فهرسة الإنجاز التكنولوجي والعلمي الخاص على تحديد الأهمية الصناعية لها. إن تسلسل الاختراعات

المحددة أدناه، وبصورةٍ غير شاملة، يقدم سياق مؤقت لبعض الاكتشافات الرئيسة في مجالات التقنية الحيوية الصناعية وتقنية الحامض النووي المعدل، والتي قد انتهت بإيجاد أول منتج أساسي ذو قيمة مضافة عن طريق الهندسة الأيضية الأمامية الموسعة.

في عام ١٩٤٨م تم منح براءة اختراع أمريكية لمعمل كولد سبرنج هاربر (كولد سبرنج هاربر، نيويورك، الولايات المتحدة الأمريكية) بعنوان "إنتاج البنيسيلين"، التي تنص على "إن موضوع هذا الاختراع هو إنتاج البنسيلين بكميات كبيرة للغاية". والموضوع الآخر هو إنتاج طفرات للفطريات من جنس الميسيتات قادرة على إنتاج كميات كبيرة من أوساط المضاد الحيوي" [٧٦]. وفي عام ١٩٨٢م تم منح شركة جينين تك (جنوب سان فرانسيسكو، كاليفورنيا، الولايات المتحدة الأمريكية) براءة اختراع بعنوان "طريقة لتعبير البولي ببتيدات الميكروبية"، التي ذكرت السوماتوستاتين، مثبط لهرمون النمو، كمثال للبولي ببتيد، على النحو التالي:

> على الرغم من العمل واسع النطاق في السنوات الأخيرة في أبحاث الحمض النووي الدنا، فقد ظهرت بعض النتائج القابلة للتطبيق الفوري والعملي. وقد أثبت هذا ولاسيما في حالة المحاولات الفاشلة للتعبير عن البولي الببتيدات ومثيلها المشفر بواسطة "الدنا التخليقي"، والناتجة إما من الطريقة التقليدية بإنشاء نيوكليوتيدة ثم أخرى وإما عن طريق الاستنساخ العكسي من الحمض النووي الريبوزي الرسول (المكمل أو "الدنا الحلقي"). وفي هذا التطبيق فإننا نصف ما يبدو على أنه يمثل التعبير الأول لمنتج بولي ببتيدي وظيفي من جين تخليقي، مع التطويرات المتعلقة التي تبشر بتطبيقها بشكل منتشر [٧٧].

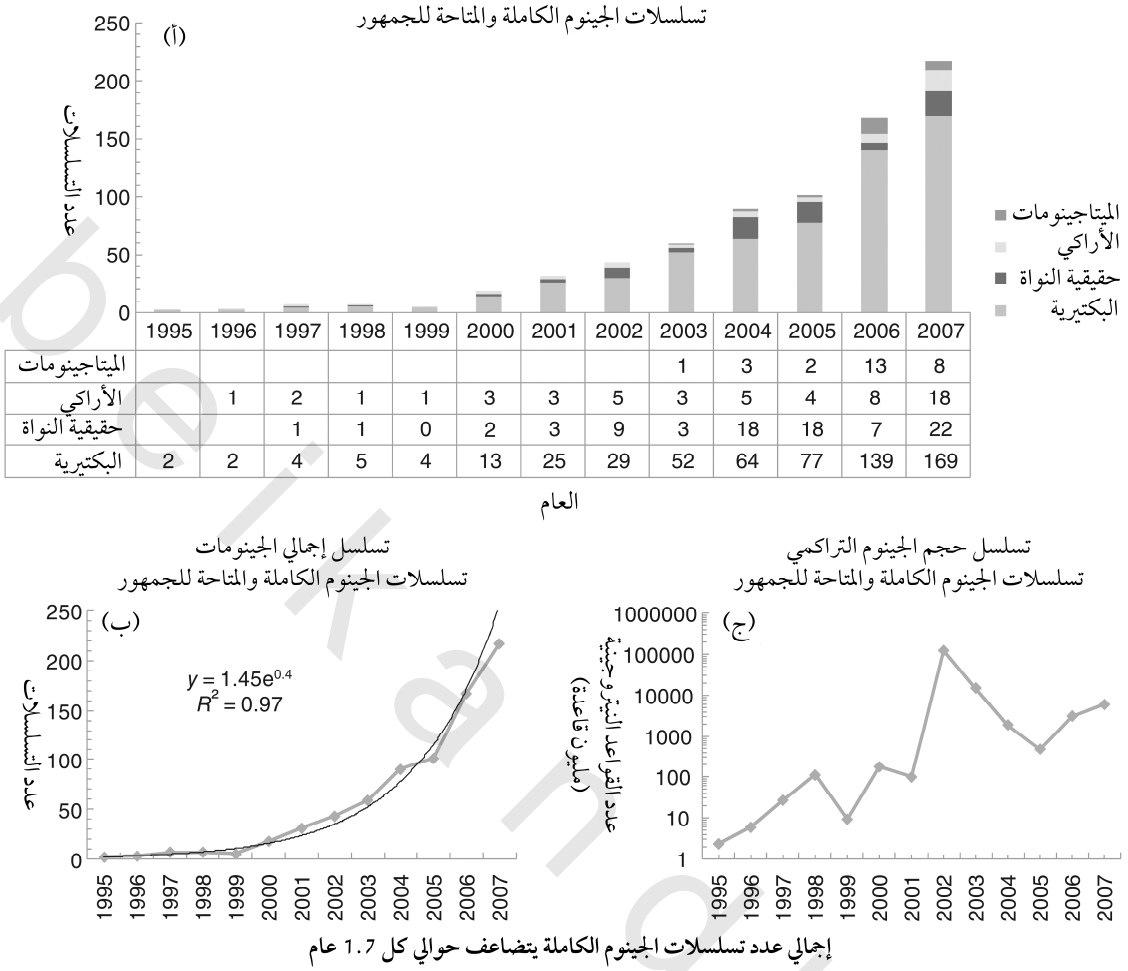
وفي عام ١٩٨٥م تم منح مؤسسة بردو البحثية (لافاييت الغربية، إنديانا، الولايات المتحدة الأمريكية) براءة اختراع بعنوان "التخمير المباشر للدي-زيلوز إلى الإيثانول بواسطة طفرة خميرة التي تخمر الزيلوز"، حيث ذكروا، "يتم وصف عملية لإنتاج طفرات الخمائر القادرة على استخدام دي-زيلوز إلى الإيثانول بعائد كبير" [٧٧]، وكانت طفرة الخميرة هي الكانديدا XF217 والسكارروميسيس سيرفيسي SCXF138. وفي عام ١٩٩٧م تم منح شركة دوبونت (ويلمينجتون، ديلوار، الولايات المتحدة الأمريكية) براءة اختراع أمريكية بعنوان "التحويل الحيوي لمصدر كربوني قابل للتخمير إلى ٣،١-بروبان دايول بواسطة كائن دقيق واحد [٧٨]". وقد وصفت براءة الاختراع هذه مسارات الأيض الموجودة في الكائنات الدقيقة الحية المنتجة بشكل طبيعي (مثل جنس السيتروباكتر، جنس الكلوستريديوم، جنس الكليبسيلا)، ونشاطات الإنزيمات المحددة المطلوبة من أجل إعادة توجيه تدفق الكربون وتوازن الأكسدة والاختزال (على سبيل المثال: توليد NAD^+). وفي أحد أكبر العمليات الناجحة للهندسة الأيضية الحديثة، تم وصف عوامل التعبير الخاص وتقنيات الاستنساخ المستخدمة لبناء سلالة معدلة من إيشيريشيا القولون قادرة على إنتاج عالٍ من ٣،١-بروبان دايول [٧٨، ٧٩]. (ملاحظة: تم اصدار عدة براءات

اختراع أمريكية لشركة دوبونت، والشركات المتعاونة معها، مثل جينيكور العالمية، على تطوير ١،٣-بروبان دايول؛ ومع ذلك، فإن البراءة الأمريكية الصادرة في عام ١٩٩٥م تمثل أول هذه السلسلة).

وتقترح هذه الإحصائية الموجزة على مراجع براءات الاختراع في التقنية الحيوية بأنه لمدة ٤٠ عاماً تقريباً (١٩٤٨-١٩٨٥م)، أن تطوير عمليات التقنية الحيوية الصناعية قد تراجع للدرجة الثانية بالنسبة لطرق اختيار الطفرات. ومع ذلك، وفي غضون عشر سنوات إضافية (بحلول ١٩٩٧م)، تم استخدام أساليب الجينات المستهدفة لبناء مصانع الخلايا الميكروبية القادرة على إنتاج الكيماويات ذات القيمة المضافة العالية.

وسوف يتذكر ذوو الخبرة الصناعية أنه في أواخر الثمانينيات وأوائل التسعينيات، مع ظهور تقنية الحامض النووي الدنا المعدل من التقنية الحيوية الطبية، فإننا قد شهدنا محاولة تخليق المركبات والتي تم إنتاجها مسبقاً بواسطة المسارات التخليقية في كائنات الإنتاج [٢٨، ٨٠-٨٢]. وشملت هذه المركبات حمض إل-جلوتامك (مليون طن سنوياً)، وحمض الستريك (مليون طن سنوياً)، وإل-ليسين (٣٥٠ ألف طن سنوياً)، وحمض اللاكتيك (٢٥٠ ألف طن سنوياً)، وإنزيمات معاملة الأغذية (١٠٠ ألف طن سنوياً)، وفيتامين ج (٨٠ ألف طن سنوياً)، وحمض الجلوكونيك (٥٠ ألف طن سنوياً)، والمضادات الحيوية (٣٥ ألف طن سنوياً)، وإنزيمات الأعلاف (٢٠ ألف طن سنوياً)، والزانثان (١٠ آلاف طن سنوياً)، وإل-هيدروكسي فينيل ألانين (١٠ آلاف طن سنوياً)، وفيتامين ف (ألف طن سنوياً)، وفيتامين ب١٢ (١٢ طن سنوياً)، ولذكر البعض [٥، ٨٣-٨٥]. وقد تم إتاحة ذلك عن طريق إدخال التسلسلات الوراثية التي ترمز للإنزيمات التي قد تحفز وجود التفاعلات المطلوبة، أو حذف الجينات التي قد تعمل على التنظيم الخفضي للتفاعلات والمسارات غير المرغوب فيها. وقد استندت تلك الأساليب على الافتراضات، وذات مصادر مكثفة وإنتاجية منخفضة، مما قلل من احتمال تحديد الطرز الجيني بنجاح والتي قد تظهر بوصفها نمطاً ظاهرياً متطوراً. وكانت الميزة الحقيقية للطفرات العشوائية وفحصها واختيارها هي المجال التجريبي الكبير الذي يمكن تغطيته، حتى في حالة التضحية بالفهم الميكانيكي. وكانت الميزة الأخرى هي سجل التتبع لها. بعد ذلك بعشر سنوات تقريباً وما الذي تغير؟

على الرغم من وجود الأساليب التي سمحت بمعالجة الحمض النووي الدنا، فإن تسلسلات الجينوم المشروحة الخاصة بعوائل الإنتاج الصناعي لم تكن متاحة. ويوضح الشكل رقم (٢,٤) الزيادة التصاعدية في تسلسلات الجينوم المنشورة التي بدأت في أول مرة عام ١٩٩٥م واستمرت في التوسع حتى عام ٢٠٠٨م بإجمالي ٧٣٠ مشروعاً تسلسل جينوم و٩٠٥، و١٧٦٣م، و٩١ مشروع تسلسل جينوم جاري بحثها حالياً للبكتيريا، والخلايا حقيقية النواة، والأراكي، على التوالي. ويوضح الشكل رقم (٢,٤ أ) وصفاً لعدد تسلسلات الجينوم الكاملة التي تم اكتشافها تبعاً لتصنيف الكائن (الأراكي، الخلايا حقيقية النواة، والميتاجينومات).



	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
الميتاجينومات									1	3	2	13	8
الأراكي		1	2	1	1	3	3	5	3	5	4	8	18
حقيقية النواة			1	1	0	2	3	9	3	18	18	7	22
البكتيرية	2	2	4	5	4	13	25	29	52	64	77	139	169

الشكل رقم (٢,٤). تسلسلات الجينوم الكاملة والمتاحة للجمهور. ملخص لخصائص كل تسلسلات الجينوم الكاملة المتاحة للجمهور على أساس سنوي بين عامي ١٩٩٥-٢٠٠٧م. تم تحوير البيانات من قاعدة بيانات الجينومات المباشرة.

وعلى الرغم من تزايد اكتشاف التسلسل لجينومات الأراكي وحقيقيات النواة، فإن البكتيريا تشكل الغالبية العظمى من الكائنات التي يتم اكتشاف تسلسلها. وكما هو موضح في الشكل رقم (٢,٤ ب)، فقد تضاعف عدد تسلسلات الجينوم كل ١,٧ سنة، على الرغم من أن البيانات التي تم الحصول عليها عام ٢٠٠٦م، ٢٠٠٧م و٢٠٠٨م (غير مبينة) تقترح أن معدل تسلسل الجينوم هذا ينخفض. في حين أن الشكل رقم (٢,٤ ب) يأخذ فقط تسلسلات الجينوم التي تم إكمالها في الاعتبار، فإن الشكل رقم (٢,٤ ج) يقدم الحجم التراكمي للجينات المسلسلة. وعلى وجه الخصوص فقد تم تلخيص حجم كل جينوم مسلسل على مستوى كافة الجينومات المسلسلة في عام معين (لم يتم إدراج تغطية كل الجينومات المسلسلة في هذه العملية الحسابية). وقد زاد حجم الجينوم المتراكم

بشكل كبير حتى عام ١٩٩٨م؛ ومع ذلك، فبين عام ١٩٩٩م و٢٠٠١م، فقد كان هناك انخفاضاً ملحوظاً، ينتهى بزيادة هائلة في عام ٢٠٠٢م. وبين عامي ٢٠٠٢-٢٠٠٥م انخفض الحجم التراكمي بصورة كبيرة. وبين عامي ٢٠٠٥-٢٠٠٧م كانت هناك زيادة، على الرغم من أنها مازالت أقل من مستويات عام ٢٠٠٢م. ويوضح الشكل رقم (٤, ٢ ب، ج) أنه في حين توجد زيادة في عدد تسلسلات الجينوم الإجمالية التي تم إكمالها والمتاحة للجمهور، فإن حجم هذه الجينومات لم يزداد. وهذا يتلاءم مع ملاحظة أن الجينومات الأصغر حجماً، مثل تلك الممثلة بالميتاجينومات في الكائنات البكتيرية قد سيطرت على معظم جهود التسلسل الأخيرة.

كانت هذه الثورة الجينومية مدفوعة أساساً بمجال البحث الطبي، كما هو موضح بالجدول رقم (٢, ٢)، الذي يقدم خصائص للجينات المسلسلة ما بين عامي ١٩٩٥-١٩٩٩م. ومن الجدير بالملاحظة أنه في حين تم تصنيع منتجات التقنية الحيوية الصناعية مثل حمض الستريك والبنيسيلين والأحماض الأمينية خلال هذا الوقت، إلا أن تسلسلات الجينوم لعوائل الإنتاج الصناعي لم تكن متاحة. وتم تطبيق الكائنات الباقية، الموضحة تبعاً لأهميتها، في التقنية الحيوية الطبية والدواء البشري [٨٦]. ويمكن ملاحظة أنه يمكن فقط اعتبار أن ثلاث تسلسلات فقط من بين ٢٤ تسلسل متاحة لها إمكانية تطبيق شاملة في قطاع التقنية الحيوية الصناعية: السكارروميسيس سيرفيسي، إيشيريشيا القولون، والباسيلس ساتليس، في حين تم دفع الباقي بواسطة المجال الطبي. ويمكن للمرء أن يجادل بأن تسلسل تلك الجينومات الثلاثة كان بدافع الأهمية الطبية لها، إما بوصفها كائناً نموذجياً للخلايا حقيقية النواة وإما عاملاً ممرضاً نموذجياً.

وفي حالة انتقالنا بعد عام ١٩٩٩م، كما هو موضح بالجدول رقم (٣, ٢)، فقد تم وضع تسلسل جينومات عدة مصانع خلوية صناعية مهمة، وقد أصبح تسلسل الجينوم حتى مع وجود خفض كبير في تكاليف التسلسل أداة لتحليل المصانع الخلوية ذات الأنماط الظاهرية المختلفة. ويوفر الجدول رقم (٣, ٢) ملخصاً لكافة تسلسلات الجينومات المتاحة والمنشورة بين يناير ٢٠٠٧م وفبراير ٢٠٠٨م [٨٦]. وقد تم خلال هذه الفترة نشر إجمالي ٩٦ جينوم مع تصنيف ٣٤ على أنهم لديهم أهمية للتقنية الحيوية و/ أو البيئة. وكان عدد الكائنات المسلسلة ذو أهمية خاصة، مدفوعاً من قبل عمليات التقنية الحيوية الصناعية، حيث تم الاستشهاد بمنتجات محددة مثل حمض الستريك والإيثانول الحيوي وحمض اللاكتيك والأحماض الأمينية (على سبيل المثال الجلوتامات). وعلى الرغم من أن جزءاً كبيراً من تسلسلات الجينومات، حوالي الثلثين، كان بدافع التقنية الحيوية الطبية، فقد ازداد عدد الجينومات المسلسلة المرتبطة بالتقنية الحيوية الصناعية. وقد أكدت على هذا عن طريق استعراض الميزانيات التشغيلية للسنة المالية ٢٠٠٨م الخاصة بالمعهد القومي الأمريكي للصحة، والمقدرة بـ ٢٩, ٥ مليار دولار أمريكي، مقارنة بوزارة الطاقة الأمريكية، قسم كفاءة الطاقة والطاقة المتجددة، بمقدار ١, ٧ مليار دولار [٨٧، ٨٨].

الجدول رقم (٢ , ٢). خصائص تسلسلات الجينوم المتاحة للجمهور المنشورة بين عامي ١٩٩٥-١٩٩٩م.

التاريخ	المجال[أ]	الكائن	الأهمية	الحجم (كيلو قاعدة)	عدد الـ ORFs	النشر
يوليو ١٩٩٥م	ب	*Haemophilus influenza*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	١٨٣٠	١٦٥٧	*Science* 269, 496-512
أكتوبر ١٩٩٥م	ب	*Myxoplasma genitalium*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان والحيوانات	٥٨٠	٤٧٧	*Science* 270, 397-403
يونيو ١٩٩٦م	ب	*Synechocystis sp.*	التقنية الحيوية، بيئية، دورة كربون المحيطات	٣٥٧٣	٣١٧٢	*DNA Res.* 3, 109-136
سبتمبر ١٩٩٦م	أ	*Methanocladococcus jannaschii*	التقنية الحيوية، إنتاج الطاقة	١٦٦٤	١٧٢٩	*Science* 273, 1058-1073
نوفمبر ١٩٩٦م	ب	*Mycoplasma pneumonia*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	٨١٦	٦٨٩	*Nucleic Acids Res.* 24, 4420-4449
مايو ١٩٩٧م[ب]	**ح**	***Saccharomyces cerevisiae***	**كائن نموذجي**	**١٢٠٦٩**	**٥٨٦٠**	***Nature* 387, 5-105**
أغسطس ١٩٩٧م	ب	*Helicobacter pylori*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	١٦٦٧	١٥٧٦	*Nature* 388, 539-547
سبتمبر ١٩٩٧م	**ب**	***Escherichia coli***	**طبي**	**٤٦٣٩**	**٤٢٤٣**	***Science* 277, 1453-1474**
نوفمبر ١٩٩٧م	أ	*Methanothermobacter thermoautotophicus*	التقنية الحيوية، إنتاج الطاقة	١٧٥١	١٨٧٣	*J. Bacteriol.* 179, 7135-7155
نوفمبر ١٩٩٧م	**ب**	***Bacillus subtilis***	**التقنية الحيوية**	**٤٢١٤**	**٤١٠٥**	***Nature* 390, 249-256**
نوفمبر ١٩٩٧م	أ	*Archaeoglobus fulgidus*	التقنية الحيوية	٢١٧٨	٢٤٢٠	*Nature* 390, 364-370
ديسمبر ١٩٩٧م	ب	*Borrelia burgdorferi*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	٩١٠	٨٥١	*Nature* 390, 580-586
مارس ١٩٩٨م	ب	*Aquifex aeolicus*	التقنية الحيوية	١٥٥١	١٥٢٩	*Nature* 392, 353-358
إبريل ١٩٩٨م	أ	*Pyrococcus horikoshii (shinkaj)*	التقنية الحيوية	١٧٣٨	١٩٥٥	*DNA Res.* 5, 55-76
يونيه ١٩٩٨م	ب	*Mycobacterium tuberculosis*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان والحيوانات	٤٤١١	٤٤٠٢	*Nature* 393, 537-544
يوليو ١٩٩٨م	ب	*Treponema pallidum*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	١١٣٨	١٠٣٦	*Science* 281, 375-388
أكتوبر ١٩٩٨م	ب	*Chlamydia trachomatis*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان والحيوانات	١٠٤٢	٨٩٥	*Science* 282, 754-759
نوفمبر ١٩٩٨م	ب	*Rickettsia prowazekii*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان، تهديد حيوي	١١١١	٨٣٥	*Nature* 396, 133-140
ديسمبر ١٩٩٨م	ح	*Caenorhabditis elegans*	كائن نموذجي	١٠٠٢٧٢	٢٣٢٠٩	*Science* 282, 2012-2018
يناير ١٩٩٩م	ب	*Helicobacter pylori*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	١٦٤٣	١٤٩١	*Nature* 397, 176-180
إبريل ١٩٩٩م	ب	*Chlamydophila pneumonia*	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	١٢٣٠	١٠٥٢	*Nat. Genet.* 21, 385-389
إبريل ١٩٩٩م	أ	*Aeropyum pernix*	التقنية الحيوية	١٦٦٩	١٧٠٠	*DNA Res.* 6, 83-101
مايو ١٩٩٩م	ب	*Thermotoga maritime*	التقنية الحيوية، إنتاج الطاقة، تطويري	١٨٦٠	١٨٥٨	*Nature* 399, 323-329
نوفمبر ١٩٩٩م	ب	*Deinococcus radiodurans*	بيئية، معالجة حيوية	٣٠٦٠	٢٦٣٧	*Science* 286, 1571-1577

أ) البكتيريا (ب)، الخلايا حقيقية النواة (ح)، الأراكي (أ).

ب) تمثل التسلاسلات الموضحة بخط أسود الكائنات المهمة التي استخدمت بصورة واسعة لتطبيقات التقنية الحيوية الصناعية.

obeikandl.com

الجدول رقم (٣, ٢). خصائص تسلسلات الجينومات المتاحة للجمهور والتي تم نشرها في عام ٢٠٠٧م.

التاريخ	المجال[a]	الكائن	الأهمية	الحجم (كيلو قاعدة)	عدد الـ ORFs	النشر
يناير ٢٠٠٧م	ب	*Prochlorococcus marinus*	دورة الكربون، بيئية، MMI	١٦٦٩	١٩٢١	*PLoS Genet. 3, e231*
يناير ٢٠٠٧م	ب	*Prochlorococcus marinus*	دورة الكربون، بيئية، MMI	١٧٠٤	١٩٠٦	*PLoS Genet. 3, e231*
يناير ٢٠٠٧م	أ	*Hyperthermus butylicus*	تقنية حيوية	١٦٦٧	١٦٠٢	*Archaea 2, 127-35*
يناير ٢٠٠٧م	ب	*Prochlorococcus marinus*	دورة الكربون، بيئية، MMI	١٨٦٤	٢١٩٣	*PLoS Genet. 3, e231*
يناير ٢٠٠٧م	ب	*Prochlorococcus marinus*	دورة الكربون، بيئية، MMI	٢٦٨٢	٢٩٩٧	*PLoS Genet. 3, e231*
يناير ٢٠٠٧م	ح	*Aspergillus niger*	تقنية حيوية، التخمير، إنتاج حمض الستريك	٣٣٩٠٠	١٤١٦٥	*Nat. Biotechnol. 25, 221-231*
يناير ٢٠٠٧م	ب	*Rubrivivax (Methylibium) gelatinosus (petroleiphilum)*	بيئية، المعالجة الحيوية	٤٠٤٤	٣٨١٩	*J. Bacteriol. 189, 931-45*
يناير ٢٠٠٧م	ب	*Lactococcus lactis cremoris*	صناعة الغذاء، تقنية حيوية	٢٥٢٩	٢٤٣٤	*J. Bacteriol. 189, 3256-3270*
فبراير ٢٠٠٧م	ح	*Ustilago maydis*	زراعية، مسببات أمراض النبات	٢٠٥٠٠	٦٩٠٢	*Nature 444, 97-101*
فبراير ٢٠٠٧م	ب	*Streptococcus sanguinis*	طبية، مسببات أمراض الإنسان	٢٣٨٨	٢٢٧٠	*J. Bacteriol. 189, 3166-3175*
فبراير ٢٠٠٧م	ب	*Actinobacillus pleuropneumoniae*	مسببات أمراض الحيوان، طبية، مسببات أمراض الخنازير	٢٢٧٤	٢٠١٢	*J. Bacteriol. 190, 1495-1496*
فبراير ٢٠٠٧م	ح	*Pichia stipitis*	تقنية حيوية، إنتاج الطاقة، إنتاج الإيثانول، التخمير	١٥٤٢٦	٥٨١٦	*Nat. Biotechnol. 25, 319-326*
مارس ٢٠٠٧م	ب	*Acinetobacter baumannii*	مسببات أمراض الإنسان، طبية	٣٩٧٦	٣٣٥٢	*Genes Dev. 21, 601-614*
مارس ٢٠٠٧م	أ	*Uncultured methanogenic archaeon RC-I*	تقنية حيوية	٣١٧٩	٣٠٨٥	*Science 313, 370-372*
مارس ٢٠٠٧م	ب	*Prochlorococcus marinus*	دورة الكربون، بيئية، MMI	١٦٤١	١٩٠٧	*PLos Genet. 3, e231*
مارس ٢٠٠٧م	ب	*Herminiimonas (Cenibacterium) arsenicoxydans*	تقنية حيوية، بيئية	٣٤٢٤	٣٣٢٥	*PLos Genet. 13, e53*
مارس ٢٠٠٧م	ب	*Saccharopolyspora erythraea*	تقنية حيوية، إنتاج المضاد الحيوي، إنتاج الإيريثرومايسين	٨٢١٢	٧١٩٨	*Nat. Biotechnol. 25, 447-453*
مارس ٢٠٠٧م	ب	*Francisella tularensis tularensis*	مسببات أمراض الحيوان، طبية	١٨٩٨	١٦٣٤	*PLos ONE 2, e947*
مارس ٢٠٠٧م	ب	*Geobacillus thermodenitrificans*	بيئية، تقنية حيوية	٣٦٠٧	٣٣٩٢	*PNAS 104, 5602-5607*
إبريل ٢٠٠٧م	ب	*Corynebacterium glutamicum*	تقنية حيوية، إنتاج الجلوتامات، إنتاج الأحماض الأمينية، صناعة الأغذية	٣٣٠٠	٣٠٥٢	*Microbiology 153, 1042-1058*
إبريل ٢٠٠٧م	م	*Marine microbial communities*	بيئية، MMI	لا يوجد	٦١٢٣٣٩٥	*PLos Biol. 5, e77*

obeikandl.com

تابع الجدول رقم (٣, ٢).

التاريخ	المجال*	الكائن	الأهمية	الحجم (كيلو قاعدة)	عدد الـ ORFs	النشر
إبريل ٢٠٠٧م	ح	*Macaca mulatta*	لا يوجد	٢٨٧١١٨٩	٣٤٠٢٣	*Science 316, 222-234*
إبريل ٢٠٠٧م	ب	*Salinispora tropica*	تقنية حيوية، علاج السرطان، طبية	٥١٨٣	٤٥٣٦	*PNAS 104, 10376-10381*
إبريل ٢٠٠٧م	ب	*Streptococcus suis*	طبية، مسبب أمراض الإنسان، مسبب أمراض الخنازير، مسبب أمراض للحيوانات	٢٠٩٥	٢١٩٨	*PLos ONE 2, E315*
إبريل ٢٠٠٧م	ب	*Streptococcus suis*	طبية، مسبب أمراض الإنسان، مسبب أمراض الخنازير، مسبب أمراض للحيوانات	٢٠٩٦	٢١٨٦	*PLos ONE 2, E315*
إبريل ٢٠٠٧م	أ	*Metallosphaera sedula*	المعالجة الحيوية، تقنية حيوية	٢١٩١	٢٢٥٦	*Appl. Environ. Microbiol. Epub*
مايو ٢٠٠٧م	ب	*Bradyrhizobium sp.*	زراعية	٧٤٥٦	٦٧١٧	*Science 316, 1307-1312*
مايو ٢٠٠٧م	ح	*Ostreococcus lucimarinus*	لا يوجد	١٣٢٠٠	٧٦٥١	*PNAS 104, 7705-7710*
مايو ٢٠٠٧م	ب	*Dichelobacter nodosus*	طبية، مسببات أمراض الحيوان	١٣٨٩	١٢٨٠	*Nat. Biotechnol. 25, 569-575*
مايو ٢٠٠٧م	ب	*Orientia (Rickettsia) tsutsugamushi*	طبية، مسببات أمراض الحيوان	٢١٢٧	١١٨٢	*PNAS 104, 7981-7986*
مايو ٢٠٠٧م	و	*Monodelphis domestica*	لا يوجد	لا يوجد	١٨٠٢٢	*Nature 447, 167-177*
مايو ٢٠٠٧م	ب	*Bradyrhizobium sp.*	زراعية	٨٢٦٤	٧٣٩٤	*Science 316, 1307-1312*
مايو ٢٠٠٧م	ب	*Staphylococcus aureus aureus*	طبية، مسببات أمراض الإنسان والحيوان والمواشي والدواجن	٢٩٠٦	٢٦٩٧	*PNAS 104, 9451-9456*
مايو ٢٠٠٧م	ب	*Clavibacter(Corynebacterium) michiganensis michiganensis*	زراعية، مسببات أمراض النبات	٣٢٩٧	٢٩٨٤	*J. Bacteriol. 190, 2138-2149*
مايو ٢٠٠٧م	ب	*Vesicomyosocius okutanii*	تطورية	١٠٢٢	٩٣٧	*Curr. Biol. 17, 881-886*
مايو ٢٠٠٧م	ب	*Clostridium botulinum*	طبية، مسببات أمراض الإنسان، تهديد حيوي	٣٨٨٦	٣٥٧٤	*Genome Res. 17, 1082-1092*
يونيو ٢٠٠٧م	م	*Simulated microbial communities*	لا يوجد	٢٦٢٨٦٠	٣٥٢٢٣٠	*Nat. Methods 4, 495-500*
يونيو ٢٠٠٧م	أ	*Methanobrevibacter smithii*	طبية، HGMI	١٨٥٣	١٧٩٣	*PNAS 104, 10643-10648*
يونيو ٢٠٠٧م	م	*Oral TM7 microbial communities*	طبية	٣٤٥٠	٤٠٧٨	*PNAS 104, 11889-11894*
يونيو ٢٠٠٧م	ح	*Aedes aegypti*	مسببات أمراض الحيوان والإنسان، طبية	١٣٨٠٠٠٠	لا يوجد	*Science 316, 1718-1723*
يونيو ٢٠٠٧م	ب	*Flavobacterium psychrophilum*	طبية، مسببات أمراض الأسماك	٢٨٦١	٢٤١٢	*Nat. Biotechnol. 25, 763-769*
يونيو ٢٠٠٧م	ب	*Bacteroides vulgatus*	طبية، مسببات أمراض الحيوان، والإنسان، HGMI	٥١٦٣	٤٠٦٥	*PloS Bio. 5, E156*

obeikandl.com

تابع الجدول رقم (٣, ٢).

التاريخ	المجال*	الكائن	الأهمية	الحجم (كيلو قاعدة)	عدد الـ ORFs	النشر
يونيو ٢٠٠٧م	ب	*Parabacteroides distasonis*	طبية، مسببات أمراض الحيوان، والإنسان، HGMI	٤٨١١	٣٨٥٠	*PloS Bio. 5, E156*
يونيو ٢٠٠٧م	ب	*Staphylococcus aureus*	طبية، مسببات أمراض الحيوان، والماشية، والإنسان، والدواجن	٢٩٠٦	٢٧٤٧	*PNAS 104, 9451- 9456*
يوليو ٢٠٠٧م	ب	*Staphylococcus aureus aureus*	طبية، مسببات أمراض الحيوان، والإنسان	٢٨٧٨	٢٦١٤	*J. Bacteriol. 190, 300-310*
يوليو ٢٠٠٧م	ب	*Janthinobacterium sp.*	بيئية، طبية	٤١١٠	٣٦٩٧	*PloS Genet. 3(8), E138*
يوليو ٢٠٠٧م	م	*Soil microbial communities*	لا يوجد	لا يوجد	لا يوجد	*ISME J. 1, 283-290*
يوليو ٢٠٠٧م	ب	*Clostridium kluyveri*	تقنية حيوية	٣٩٦٤	٣٨٣٨	*PNAS 105. 2128-2133*
يوليو ٢٠٠٧م	ب	*Clostridium botulinum A*	التهديد الحيوي، طبية، مسببات أمراض الإنسان	٣٨٦٣	٣٥٥٢	*PLOS ONE 25, e1271*
يوليو ٢٠٠٧م	ب	*Clostridium botulinum A*	التهديد الحيوي، طبية، مسببات أمراض الإنسان	٣٧٦٠	٣٤٠٧	*PLOS ONE 25. 1281-1289*
يوليو ٢٠٠٧م	ب	*Sulfurovum sp.*	بيئية	٢٥٦٢	٢٤٣٨	*PNAS 104. 12146-12150*
يوليو ٢٠٠٧م	ب	*Nitratiruptor sp.*	بيئية	١٨٧٧	١٨٤٣	*PNAS 104. 12146-12150*
يوليو ٢٠٠٧م	ب	*Yersinia pseudotuberculosis*	طبية، مسببات أمراض الإنسان	٤٧٢٣	٤١٢٤	*PLoS Genet. 3(8), E142*
أغسطس ٢٠٠٧م	ب	*Bacillus amyloloiquefaciens*	تقنية حيوية، إنتاج المضاد الحيوي، تثبيط مسببات أمراض النبات، وزراعية	٣٩١٨	٣٦٩٣	*Nat. Biotechnol. 25, 1007-1014*
أغسطس ٢٠٠٧م	ح	*Vanderwaltozyma polyspora*	تطورية	١٤٦٦١	٥٣٦٧	*PNAS 104, 8397–8402*
أغسطس ٢٠٠٧م	ح	*Nematostella vectensis*	كائن نموذجي	٢٩٧٣٩٨	لا يوجد	*Science 317, 86-94*
سبتمبر ٢٠٠٧م	ح	*Fusarium (Gibberella) graminearum (zeae)*	زراعية، ومسببات أمراض النبات، FGI	٣٦٠٠٠	لا يوجد	*Science 317, 1400-1402*
سبتمبر ٢٠٠٧م	م	*Marine plankton communities*	بيئية	٧٢٠٠	لا يوجد	*PLOS ONE 2(9), e914*
سبتمبر ٢٠٠٧م	ب	*Campylobacter jejuni jejuni*	طبية، مسببات أمراض الإنسان	١٦٢٨	١٦٢٦	*J. Bacteriol. Epub*
سبتمبر ٢٠٠٧م	ب	*Prochlorococcus marinus*	دور الكربون، بيئية.	١٧٣٨	١٩٨٣	*POLoS Genet.3, e231*
سبتمبر ٢٠٠٧م	ح	*Homo sapiens*	طبية	٢٧٨٢٣٥٧	لا يوجد	*PLoS Biol. 5, e254*
سبتمبر ٢٠٠٧م	ح	*Brugia malayi*	لا يوجد	٩٠٠٠٠	١١٥٠٠	*Science 317, 1756-1760*
سبتمبر ٢٠٠٧م	ب	*Bacillus pumilus*	تقنية حيوية، الطاقة الحيوية، طبية	٣٧٠٤	٣٦٨١	*PLoS ONE 2, e928*
سبتمبر ٢٠٠٧م	ح	*Vitis vinifera*	لا يوجد	٤٧٥٠٠٠	لا يوجد	*Nature 499, 463-467*

obeikandl.com

تابع الجدول رقم (٣, ٢).

التاريخ	المجال[a]	الكائن	الأهمية	الحجم (كيلو قاعدة)	عدد الـ ORFs	النشر
سبتمبر ٢٠٠٧م	ب	*Arcobacter butzleri*	مسببات أمراض الإنسان، طبية	٢٣٤١	٢٢٥٩	*PLoS ONE 2, e1358*
أكتوبر ٢٠٠٧م	ح	*Giardia lamblia (intestinalis)*	لا يوجد	١١١٩٢	١٣١٠٠	*Science 317, 1921-1926*
أكتوبر ٢٠٠٧م	ح	*Chlamydomonas marina*	لا يوجد	١٠٠٠٠٠	١٥٢٥٦	*Science 318, 254-250*
أكتوبر ٢٠٠٧م	ب	*Acaryochloris marina*	تقنية حيوية	٦٥٠٣	٦٢٥٤	*PNAS 105, 2005-2010*
أكتوبر ٢٠٠٧م	ح	*Babesia bovis*	لا يوجد	٨٢٠٠	٣٦٧١	*PLoS Pathog. 3, e148*
أكتوبر ٢٠٠٧م	ب	*Sorangium cellulosum*	تقنية حيوية	١٣٠٣٣	٩٣٨٤	*Nat. Biotechnol. 25, 1281-1289*
نوفمبر ٢٠٠٧م	ب	*Lactobacillus helveticus*	تقنية حيوية، صناعة الأغذية	٢٠٨٠	١٦١٠	*J. Bacteriol. 190, 727-735*
نوفمبر ٢٠٠٧م	ح	*Hemiselmis andersenii*	تطورية	٥٧١	لا يوجد	*PNAS 104, 19908-19913*
نوفمبر ٢٠٠٧م	ب	*Staphylococcus aureus aureus*	مسببات أمراض الإنسان، طبية	٢٨٧٢	٢٦٥٧	*BMC Microbiol. 7, 99*
نوفمبر ٢٠٠٧م	ب	*Bartonella tribocorum*	طبية، مسببات أمراض الفئران	٢٦١٩	٢٠٧٤	*Nat. Genet. 39, 1469-1476*
نوفمبر ٢٠٠٧م	م	*Gut microbiome*	تقنية حيوية، إنتاج الطاقة	لا يوجد	لا يوجد	*Nature 450, 560-565*
نوفمبر ٢٠٠٧م	ح	*Malassezia globosa*	مسببات أمراض الإنسان، طبية	٩٠٠٠	٤٢٨٥	*PNAS 104, 18730-18735*
نوفمبر ٢٠٠٧م	ح	*Laccaria bicolor*	زراعية	٦٥٠٠٠	لا يوجد	*Nature in press*
ديسمبر ٢٠٠٧م	ب	*Neisseria meningitides*	مسببات أمراض الإنسان، طبيه	٢١٥٣	٢٠٢٠	*Genomics 91, 78-87*
ديسمبر ٢٠٠٧م	م	*Gut microbiome*	طبية	٧٢٧٠٠٠	لا يوجد	*DNA Res. 14, 169-181*
ديسمبر ٢٠٠٧م	ب	*Candidatus sulcia muelleri*	زراعية	٢٤٥	٢٢٧	*PNAS 104, 19392-9397*
ديسمبر ٢٠٠٧م	ح	*Vitis vinifera L*	لا يوجد	٥٠٤٦٠٠	٢٩٥٨٥	*PLoS ONE 2, e1326*
ديسمبر ٢٠٠٧م	ح	*Monosiga brevicollis*	لا يوجد	٣٨٦٤٨	لا يوجد	*Nature 51, 783-788*
ديسمبر ٢٠٠٧م	ب	*Microcystis aeruginosa*	مسببات أمراض الحيوان، والإنسان، بيئية، طبية	٨٥٤٢	٦٣١٢	*DNA Res. 14, 247-256*
يناير ٢٠٠٨م	ب	*Clavibacter (Corynebacterium) michiganesis sepedonicus*	زراعية، مسببات أمراض النبات	٣٢٥٨	٣٠٥٨	*J. Bacteriol. 190, 2150-2160*
يناير ٢٠٠٨م	ب	*Actinobacillus pleuropneumoniae*	طبية، مسببات أمراض الحيوان و الخنازير	٢٢٤٢	٢٠٣٦	*PLo ONE 3, e1450*
يناير ٢٠٠٨م	ب	*Rickettsia rickettsii*	مسببات أمراض الإنسان، طبية	١٢٦٨	١٣٨٤	*Infect. Immun. 76, 542-545*
يناير ٢٠٠٨م	ب	*Chlamydia trachomatis*	مسببات أمراض الإنسان والحيوان، طبية	١٠٣٨	٨٧٤	*Genome Res. 18, 161-171*

obeikandl.com

تابع الجدول رقم (٣, ٢).

التاريخ	المجال[أ]	الكائن	الأهمية	الحجم (كيلو قاعدة)	عدد الـ ORFs	النشر
يناير ٢٠٠٨م	ب	*Chlamydia trachomatis*	مسببات أمراض الإنسان والحيوان، طبية	١٠٣٨	٨٧٤	*Genome Res. 18, 161-171*
يناير ٢٠٠٨م	ب	*Xanthomonas campestris campestris*	مسببات أمراض النبات، زراعية	٥٠٧٩	٤٤٧١	*J. Biotechnol. Epub*
يناير ٢٠٠٨م	ح	*Physcomitrella patens patens*	لا يوجد	٤٥٣٩٢٩	لا يوجد	*Science 319, 64-69*
فبراير ٢٠٠٨م	ب	*Echerichia coli*	مسببات أمراض الإنسان، طبية	٤٦٨٦	٤٣٠٥	*J. Biotechnol. Epub*
فبراير ٢٠٠٨م	ب	*Candidatus cloacamonas acidaminovorans*	تقنية حيوية، معالجة مياه الصرف	٢٢٤٦	١٨٢٠	*J. Biotechnol. Epub*
فبراير ٢٠٠٨م	ب	*Finegoldia magna*	لا يوجد	١٧٩٧	١٦٣١	*DNA Res. Epub*
فبراير ٢٠٠٨م	ب	*Leuconostoc citreum*	إنتاج الخلات، تقنية حيوية، إنتاج الإيثانول، صناعة الغذاء، إنتاج حمض اللاكتيك	١٧٩٦	١٧٠٢	*J. Biotechnol. Epub*
فبراير ٢٠٠٨م	أ	*Halobacterium salinarum*	تقنية حيوية	٢٠٠٠	لا يوجد	*Genomics in press*
فبراير ٢٠٠٨م	ب	*Lysinibacillus sphaericus*	مسببات أمراض الحشرات، زراعية	٤٦٣٩	٤٧٨٦	*J. Biotechnol. Epub*

أ) البكتيريا (ب)، الخلايا حقيقية النواة (ح)، الأراكي (أ)، الميكروبية (م).

MMI= مبادرة الميكروبات البحرية، FGI= مبادرة الجينوم الفطري، HGMI= مبادرة ميكروبيوم الأمعاء البشرية.

obeikandl.com

وقد تم تمويل كافة تسلسلات الجينومات التي ذكر أن لها أهمية في التقنية الحيوية بواسطة وزارة الطاقة الأمريكية، مما يوضح بأن علم الجينومات الوظيفية وبيولوجيا الأنظمة يتم الاعتراف بهما كميزة أساسية في تقدم التقنية الحيوية الصناعية. وبالتأكيد لم يكن هذا هو الوضع قبل عقد من الزمان طبقاً للجدول رقم (٢, ٢). وقد سمحت تسلسلات الجينومات الكاملة الموجودة بالاستهداف الأفضل للتعديلات الوراثية، والمعلومات حول قوائم الأجزاء الكاملة لمصنع خلوي معين قيماً بصورةٍ واضحة.

ومع توفر تسلسلات الجينومات لعدة كائنات نموذجية صناعية، فقد كان توضيح تلك التسلسلات هو الذي سد الفجوة بين قواعد البيانات القائمة على المعلومات المتوسعة (مثل مجموعات تسلسل الجينومات) وبين قواعد البيانات القائمة على البيانات (مثل تطبيق تسلسلات الجينوم للتوضيح، وتطوير النماذج، والفهم الأعمق) [٨٩]. وقد تطور توضيح تسلسلات الجينومات إلى مجالٍ معرف بصورةٍ جيدة والذي يشار إليه بعلم الجينومات الوظيفية والذي يركز على تطوير عدة أدوات تجريبية ونظرية لتحديد وظيفة الجين [٩٠]. وقد سمح علم الجينومات الوظيفية، من خلال ربط منتجات الجينات (مثل الإنزيمات) بوظائف الجينات (مثل القياس الكمي الكيميائي للتفاعل) بتطوير نماذج على مستوى الجينوم لمختلف أنواع البيانات، مثل نماذج شبكة الأيض المعاد هيكلتها.

(٦, ٢) نماذج شبكات الأيض المعاد هيكلتها Reconstructed Metabolic Network Models

(١, ٦, ٢) مقدمة Introduction

على الرغم من أن تسلسل الجينوم قد سهل بوضوح من استخدام التعديلات الوراثية المستهدفة لبناء المصانع الخلوية بأنماط ظاهرية مرغوبة، إلا أن الخطوة الأساسية للأمام تمثلت في إدخال الهندسة الأيضية، العلم الذي مكن من تصميم وبناء المصانع الخلوية. وتشمل الهندسة الأيضية تحديد التعديلات الوراثية المستهدفة والمحددة (حذف الجينات، والتعبير المفرط، أو التعديل) متبوعاً بتطبيق تلك التعديلات بواسطة أدوات البيولوجيا الجزيئية التي تؤدي إلى إعادة توجيه التدفقات لتحسين الإنتاج أو الثبات لمنتج أو كائن، على التوالي [٣٢، ٩١-٩٥] (الشكل رقم ٢, ٢). وكانت التقنية الأساسية في التطبيق الناجح للهندسة الأيضية هي إتاحة الجينوم الموضح بشكل جيد، بما في ذلك الأدوات الكمية التي تسمح بالفحص والمعاملة الدقيقين للجينوم. وقد كان التطور الأخير في نماذج الأيض على النطاق الجينومي (GSMMs) من بين هذه الأدوات. ولتطوير نموذج للأيض الخلوي يتيح توقع مظاهر التركيز كدالات في الزمن، فإن ذلك يتطلب الكيمياء الرياضية ومعدلات التفاعل الحركية لكل تفاعل كيميائي حيوي في خلية تحت الظروف الفسيولوجية. وحالياً، فإن هذه المعلومات غير متاحة، إما من خلال التقدير وإما من خلال القياس التجريبي. ومع ذلك، فمن خلال الشرح الدقيق اعتماداً على المعلومات الكيميائية الحيوية

الحالية، واستعراض المراجع، والتجارب المعملية؛ فإنه يمكن ربط الجينات المعروفة بالتفاعلات الكيميائية الحيوية المعروفة والرياضة الكيميائية الخاصة بها. وينتج عن ذلك نموذج كيميائي حيوي يصف تكوين واستهلاك كل منتج أيضي. وعن طريق توفير ظروف حدود توازن الكتل، فإن هذا يتيح المحاكاة المعتمدة على القيود لكيفية عمل شبكة الأيض تحت الظروف المختلفة. وبمعنى أبسط، فإنه يمكننا باستخدام الرياضيات الكيميائية الأساسية استخدام تلك النماذج لتوقع العلاقات بين الجينات ذات الوظيفة في شبكات الأيض العاملة في الخلية. في حالة تغذية الخلية بـ X جرامات من الجلوكوز فإنه يمكن باستخدام البرمجة الخطية والنموذج الكيميائي الحيوي توقع الحد الأقصى من الجرامات Y_i للمنتج المتكون i.

ويتضح لنا أيضاً أنه يمكن استخدام نماذج الأيض على النطاق الجينومي (GSMMs) لتوقع المظاهر النظرية للتغيرات الوراثية التي يمكن أن تزيد من الإنتاج وتكوين الكتلة الحيوية، حتى تحت ظروف النمو المختلفة (النمو على مصادر الكربون البديلة). وقد تم تطوير الـ GSMMs لعدة كائنات إنتاج نموذجية، وكانت خطوة أساسية لا تتيح فقط الهندسة الأيضية الموجهة بالنموذج، وإنما أيضاً دمج بيانات الأوميات المختلفة وذلك للحصول على خصائص أيض تفصيلية. ويقدم الجدول رقم (٢,٤) ملخصاً شاملاً لكل الـ GSMMs التي تم استكمالها حتى الآن. ومع وجود ٣٤ شبكة تم إعادة هيكلتها، فإن هناك تنوعاً كبيراً في الكائنات الحية، تتراوح من أبسط أنواع البكتيريا (إيشيريشيا القولون) إلى الكائنات حقيقية النواة الراقية والأكثر تعقيداً (مثل الإنسان). ومع ذلك، فإن الذي يجب ملاحظته بنفس القدر من الأهمية هو أنه بينما تقدم تلك البناءات المعاد هيكلتها دعامة للتوضيحات الإضافية باستخدام بيانات الجينومات الوظيفية ومنهجية منتظمة لمحاكاة الأيض، فإن هناك فرصاً هائلة لتوسع الشبكات. وجنباً إلى جنب، فإن كافة شبكات الأيض المعاد هيكلتها لها متوسط تغطية جينوم يقدر بـ ١٤,٦ ± ٨,١٪ (ن=٢٩). وعند عزل السكارروميسيس سيرفيسي كمثال، وهي أكثر الكائنات حقيقية النواة وصفاً، فإن أحدث شبكة أيض معاد هيكلتها لها تغطية جينوم بمقدار ١٣,٦٪، في حين أن ٤٦٩١ من إجمالي ٦٦٠٨ ORFs (٧٠,٩٪) لديها وظيفة محددة [A]. وعلى الرغم من أن كل الكائنات لا تشارك نفس مستوى الخصائص، السكارروميسيس سيرفيسي، إلا أن الـ GSMMs تستمر في توضيح التحسينات الهائلة في التغطية والتي لايزال يمكن تحقيقها. وبالإضافة إلى ذلك، فإن التغطية الشاملة في الهياكل المعادة المستقبلية على مستوى الجينوم قد تشمل مناطق أقل توصيفاً من الأيض، مثل الدهون، والمسارات التي لا ترتبط تقليدياً بأيض الكربون المركزي، مثل تخليق البروتينات وطيها ونقلها.

توفر الـ GSMMs دعامة ملائمة للتوسع الإضافي وتكامل البيانات، بسبب نظامها الرياضي سهل المعاملة. وبينما تم وصف هذا النظام سابقاً، فإننا نسرده بصورةٍ مختصرة في الجزء التالي.

(٢,٦,٢) عملية الشبكة المعاد هيكلتها لمعيار الجينوم Genome-Scale Reconstructed Network Process

تم تحديد منهجية قوية لهيكلة النموذج الجديد باستخدام العدد الضخم تقريباً من الهياكل على مستوى الجينوم المتاحة حالياً (الجدول رقم ٤,٢). وهناك عدة مراجع تصف عملية إعادة هيكلة شبكة الجينوم، بما في ذلك التوضيح الكيميائي الحيوي المبدئي الذي أجري، والإطار الرياضي المستخدم لوصف الأيض، والنظام الناتج لمعادلات التفاضل الخطية، والفروض والقيود المطلوبة للتبسيط، وأخيراً طرق الحلول الرقمية [٢٠، ٩٦-٩٨]. على الرغم من أن تاريخ تحليل توازن التدفق الكمي له أصول في مختلف المجالات، ولاسيما في حالة أخذ تجارب وسط التفاعل ذات النظائر السابق مناقشتها التي أجريت في الخمسينيات، فإنه يكون مقبولاً بشكلٍ عام القول بأن تحليل توازن التدفق قد انتشر لأول مرة في الستينيات والسبعينيات. وقد ركزت المحاولات الأولى على بعض حركيات الإنزيمات الخاصة، توصيف إنزيم البيروفات كينيز في الخميرة في المعمل لحساب تدفق الجلوكوز تحت ظروف زراعة لا هوائية [٩٩]. وبالإضافة إلى ذلك، فإنه من خلال عمل ميشيل سافوج والمجموعات الأخرى في تطوير تحليل الأنظمة للعمليات الكيميائية الحيوية، قد ظهر الإطار الأشمل لما يعرف حالياً بنظرية الأنظمة الكيميائية الحيوية خلال الستينيات عبر سلسلة من المراجع القوية في *مجلة الأحياء النظرية* [١٠٠-١٠٢]. وبالتوزاي مع ذلك، طورت مجموعتين بحثيتين منفصلتين، كازر وبيرنز (١٩٧٣م) [١٠٣] وهينريش ورابوبورت (١٩٧٤م) [١٠٤-١٠٧]، إطار رياضي للتحليل الكمي لكيفية توزيع تحكم التدفق في المسارات، وهو المبدأ الذي يعرف حالياً بتحليل تحكم الأيض. ومع ذلك، فإنه يجب ملاحظة أن تحليل توازن التدفق، وخاصةً مع التحليل على مستوى الجينوم، قد تم تطويره بصورةٍ كبيرة في أواخر التسعينيات مع وجود الأدوات الحسابية المهمة والمنهجيات المتطورة التي هدفت لاستخلاص قوى توقعية أكثر من جمع النماذج المتاحة [٢٣، ١٠٨-١١١].

ومع حوالي ٣٠ نموذج أيض معياري للجينوم التي تم هيكلتها، والكثير الذي تم اقتراحه، فإنه من الضروري فحص الطريقة الأساسية لتحليل توازن التدفق. وقد تم تكييف الإطار الرياضي المبسط هنا من العرض الممتاز لتحليل توازن التدفق [١١٢]. ولاستخدام قوة هذه الطريقة، دعنا نعرف نظام أيض افتراضي مكون من نواتج أيض فريدة A، B، C، D، E وحيز تفاعل كيميائي حيوي ذي جزئين (جزء ١ و٢) (الشكل رقم ٥,٢). إن التفاعلات والكيمياء الرياضية يتم تعريفها بوضوح، ويتم إدراج توضيح التقسيمات في الكيمياء الرياضية. ولأغراض هذا المثال فسوف يتم الاشارة إلى R_1، R_2، R_5، R_6 ، وR_7 كتفاعلات تحفيزية، في حين يتم اعتبار أن R_3، R_4، R_8 ، وR_9 تفاعلات نقل متبادل. ومن الضروري ملاحظة أن التسمية والمنهج قد تختلف في هيكلة النموذج، ولكن، على سبيل المثال فإن النقل الداخلي لمنتج الأيض A_1 من الجزء ١ إلى الجزء ٢ ينتج في منتج أيض جديد وهو A_2. وعليه يعرف هذا التفاعل على أنه حفزي؛ لأنه يمكن نمذجة R_5 على أنه نضوب A_1 لتكوين A_2، حتى ولو لم تكن نواتج الأيض هذه فريدة من الناحية الكيميائية.

الجدول رقم (٤ , ٢). شبكات الأيض المعاد هيكلتها على مستوى الجينوم.

الجينوم المسلسل	المرجع	أبعاد الجينوم		خصائص شبكة الأيض					المرجع
		الحجم (كيلو قاعدة)	اجمالي الـ ORFs	اجمالي التفاعلات (فريدة)[أ]	اجمالي نواتج الأيض (فريدة)[ب]	اجمالي الجينات (انزيمات)[ج]	نسبة الجينوم المغطي[د]	التقسيمات[هـ]	النموذج[و]	
Escherichia coli										
E. coli K-12 MG1655	[١٨٠]	٤٦٣٩	٤٢٤٣	(٦٢٧)	(٤٣٨)	٦٦٠	١٥,٦	السيتوبلازم، خارج الخلية	iJE660	[١٩٩]
E. coli K-12 MG1655	[١٨٠]	٤٦٣٩	٤٢٤٣	(٩٣١)	(٦٢٥)	٩٠٤	٢١,٣	السيتوبلازم، خارج الخلية	iJR904	[٢٠٠]
E. coli K-12 MG1655	[١٨٠]	٤٦٣٩	٤٢٤٣	٢٠٧٧ (١٣٣٩)	١٦٦٨ (١٠٣٩)	١٢٦٠	٢٩,٧	السيتوبلازم، خارج الخلية	iAF1260	[٢٠١]
Saccharomyces cerevisiae										
S. cerevisiae S288C	[١٧]	١٢٠٦٩	٥٨٦٠	١١٧٥ (٨٤٢)	٥٨٤	٧٠٨	١٢,١	السيتوبلازم، الميتوكوندريا خارج الخلية	iFF708	[٢٠٢]
S. cerevisiae S288C	[١٧]	١٢٠٦٩	٥٨٦٠	١٤٨٩ (١١٤٩)	٦٤٦	٧٥٠	١٢,٨	السيتوبلازم، الميتوكوندريا البيروكسيزوم، الأغشية الاندوبلازمية، الفجوة جهاز جولجي، خارج الخلية	iND750	[٢٠٣]
S. cerevisiae S288C	[١٧]	١٢٠٦٩	٥٨٦٠	١٠٣٨	٦٣٦	٦٧٢	١١,٥	السيتوبلازم، الميتوكوندريا خارج الخلية	iLL672	[٢٠٤]
S. cerevisiae S288C	[١٧]	١٢٠٦٩	٥٨٦٠	١٤٣١	١٠١٣	٧٩٥	١٣,٦	السيتوبلازم، الميتوكوندريا خارج الخلية	iIN795	[٢٠٥]
S. cerevisiae S288C	[١٧]	١٢٠٦٩	٥٨٦٠	هناك حالياً جهد مجتمعي كبير لدمج نماذج، للسكارومايسيس سيرفيسي في نموذج عام للشبكة المعاد هيكلتها. ويتوقع أن يكون هذا النموذج العام متاحاً في عام ٢٠٠٨م.						اتصال شخصي
Haemophilus influenza										
H. influenza	[١٨١]	١٨٣٠	١٦٥٧	٤٦١	٤٥١	٤٠٠	٢٤,١	السيتوبلازم، خارج الخلية	iCS400	[٢٠٦]
Helicobacter pylori										
H. pylori 26695	[١٨٢]	١٦٦٧	١٥٧٦	٣٨٨	٤٠٣	٢٩١	١٨,٥	السيتوبلازم، خارج الخلية	iCS291	[٢٠٧]

obeikandl.com

تابع الجدول رقم (٤, ٢).

الجينوم المسلسل	المرجع	أبعاد الجينوم		خصائص شبكة الأيض					المرجع
		الحجم (كيلو قاعدة)	اجمالي الـ ORFs	اجمالي التفاعلات (فريدة)[a]	اجمالي نواتج الأيض (فريدة)[b]	اجمالي الجينات (انزيمات)[c]	نسبة الجينوم المغطي[d]	التقسيمات[e]	النموذج[f]	
H. pylori 26695	[١٨٢]	١٦٦٧	١٥٧٦	٤٧٦	٤٨٥	٣٤١	٢١,٦	السيتوبلازم، خارج الخلية	iIT341	[٢٠٨]
Plasmodium falciparum										
P. falciparum 3D7	[١٨٣]	٢٢٩٠٠	٥٢٦٨	٦٩٧	٥٢٥	(٨١٦)	لا يوجد	السيتوبلازم، خارج الخلية	iIY816	[٢٠٩]
Mannheimia succiniproducens										
M. succiniproducens MBEL55S	[١٦٠]	٢٣١٤	٢٣٨٠	٣٧٣	٣٥٢	٣٢٩	٠,١	السيتوبلازم، خارج الخلية	iSH329	[١٦٠]
M. succiniproducens MBEL55S	[١٦٠]	٢٣١٤	٢٣٨٠	٦٨٦ (٦٣٨)	٥١٩	٤٢٥	١٧,٩	السيتوبلازم، خارج الخلية	iTK425	[١٦٣]
Methanococcus jannaschii										
M. Jannaschii DSM 2661	[١٨٤]	١٦٦٤	١٧٢٩	٦٠٩	٥١٠	(٤٣٦)	لا يوجد	السيتوبلازم، خارج الخلية	iST436	[٢١٠]
Streptomces coelicolor										
*S. colicolor*A3(2) M145	[١٨٥]	٨٦٦٧	٧٧٦٩	٩٧١ (٧٠٠)	٥٠٠	٧١١	٩,٢	السيتوبلازم، خارج الخلية	iIB711	[٢١١]
Aspergillus niger										
A. niger CBS 513.88	[١٨٦]	٣٣٩٠٠	١٤١٦٥	٣٥٥	٢٨٤	٢٠	٠,١	السيتوبلازم، الميتوكوندريا جليوكسيزوم، خارج الخلية	iHD20	[٢١٢]
A. niger CBS 513.88 and *A. niger* ATCC9029[g]	[١٨٦]	٣٣٩٠٠	١٤١٦٥	٢٤٤٣	٢٣٤٩	(٩٨٨)	لا يوجد	السيتوبلازم، خارج الخلية	iJS988	[٢١٣]
A. niger CBS 513.88 and *A. niger* ATCC1015[h]	[١٨٦]	٣٣٩٠٠	١٤١٦٥	٢٢٤٠ (١١٩٠)	١٠٤٥ (٧٨٢)	٨٧١	٦,١	السيتوبلازم، الميتوكوندريا خارج الخلية	iMA871	[٢١٤]
Aspergillus nidulans										
A. nidulans FGSC A4	[١٨٧]	٣١٠٠٠	٩٥٠٠	١٢١٣ (٧٩٤)	٧٣٢ (٥٥١)	٦٦٦	٧,٠	السيتوبلازم، الميتوكوندريا جليوكسيزوم، خارج الخلية	iHD666	[٢١٥]
A. oryzae RIB40	[١٨٨]	٣٧٠٠٠	١٢٠٧٤	١٢٠٧٤ (١٦٧٩)	١٠٤٠	١١٨٤	٩,٨	السيتوبلازم، الميتوكوندريا خارج الخلية	iWV1184	[٢١٦]

obeikandl.com

تابع الجدول رقم (٤, ٢).

الجينوم المسلسل	المرجع	أبعاد الجينوم		خصائص شبكة الأيض					المرجع
		الحجم (كيلو قاعدة)	اجمالي الـ ORFs	اجمالي التفاعلات (فريدة) [أ]	اجمالي نواتج الأيض (فريدة) [ب]	اجمالي الجينات (انزيمات) [ج]	نسبة الجينوم المغطي [د]	التقسيمات [هـ]	النموذج [و]	
Lactobacillus lactis										
L. lactis IL1403	[١٨٩]	٢٣٦٥	٢٣٢١	٦٢١	٥٠٩ (٤٢٢)	٣٥٨	٣٠,٦	السيتوبلازم، خارج الخلية	iAO358	[٢١٧]
Lactobacillus plantarum										
L. plantarum WFCS1	[١٩٠]	٣٣٠٨	٣٠٠٩	٧٠٤	٦٧٠	٢١٠ (٧١٠)	٢٣,٦	السيتوبلازم، خارج الخلية	iBT710	[٢١٨]
Bacillus subtilis										
B. subtilis 168	[١٩١]	٤٢١٤	٤١٠٥	١٠٢٠	٩٨٨	٨٤٤	٢٠,٦	السيتوبلازم، خارج الخلية	iYO844	[٢١٩]
B. subtilis 168	[١٩١]	٤٢١٤	٤١٠٥	٥٦٣	لا يوجد	٥٣٤	١٣,٠	السيتوبلازم، خارج الخلية	iAG534	[٢٢٠]
Staphylococcus aureus										
S. aureus N315 (MRSA)	[١٩٢]	٢٨١٣	٢٥٨٨	٦٤٠	٥٧١	٦١٩	٢٣,٩	السيتوبلازم، خارج الخلية	iSB619	[٢٢١]
Corynebacterium glutamicum										
C. glutamicum Nakagawa	[١٩٣]	٣٣٠٩	٢٩٩٣	(٤٤٦)	٤١١	٤٤٦	١٤,٩	السيتوبلازم، خارج الخلية	iKK446	[٢٢٢]
Mycobacterium tuberculosis										
M. tuberculosis H37Rv (lab strain)	[١٩٤]	٤٤١١	٤٤٠٢	٩٣٩	٨٢٨	٦٦١	١٥,٠	السيتوبلازم، خارج الخلية	iNJ661	[٢٢٣]
M. tuberculosis H37Rv (lab strain)	[١٩٤]	٤٤١١	٤٤٠٢	٨٤٩	٧٣٩	٧٢٦ (٧٢٣)	١٦,٥	السيتوبلازم، خارج الخلية	iDB726	[٢٢٤]
Methanosarcina barkeri										
M. barkeri Fusaro	[١٩٥]	٤٨٣٧	٣٦٠٦	٦١٩	٥٥٨	٩٦٢	١٩,٢	السيتوبلازم، خارج الخلية	iAF692	[٢٢٥]
Rhizobium etli										
R. etli CFN42	[١٩٦]	٤٣٨١	٤٠٣٥	٣٨٧	٣٧١	٣٦٣	٩,٠	السيتوبلازم، خارج الخلية	iRO363	[٢٢٦]

obeikandl.com

تابع الجدول رقم (٤, ٢).

الجينوم المسلسل	المرجع	أبعاد الجينوم		خصائص شبكة الأيض					المرجع
		الحجم (كيلو قاعدة)	اجمالي الـ ORFs	اجمالي التفاعلات (فريدة) [أ]	اجمالي نواتج الأيض (فريدة) [ب]	اجمالي الجينات (انزيمات) [ج]	نسبة الجينوم المغطي [د]	التقسيمات [هـ]	النموذج [و]	
Homo sapiens										
H. sapiens	[١٩٧]	٣٢٠٠٠٠٠	٢٦٩٦٦	٣٣١١	٢٧١٢	١٤٩٦	٥,٥	السيتوبلازم، الميتوكوندريا الأغشية الاندوبلازمية، الليسوزوم، البيروكسيزوم، جهاز جولجي، النواة، خارج الخلية	Homo sapiens Recon1	[٢٢٧]
H. sapiens mitochondria [ط]	لا يوجد	لا يوجد	لا يوجد	١٨٩ (١٥٣)	٢٣٠	(٢٩٨)	لا يوجد	السيتوبلازم، الميتوكوندريا، خارج الخلية	iTV298	[٢٢٨]
Mus musculus cardiomyocyte										
Mus musculus C57BL/6J	[١٩٨]	٢٥٠٠٠٠٠	٢٤١٧٤	١٢٢٠	٨٧٢	٤٧٣	٢,٠	الفضاء خارج الخلية، السيتوسول، الميتوكوندريا	iKS473	[٢٢٩]

توضح شبكات الأيض المهيكلة للجينوم عدة عوامل مختلفة تميز تلك الشبكة. والتناسق التام بين الهياكل ليس مجدياً، ومع ذلك، فقد تم تحديد العوامل المشتركة الممكنة مما يقدم أبعاد الشبكات المعاد هيكلتها.

آ) إجمالي التفاعلات، كما حدده المؤلفون، يشمل التفاعلات داخل الخلية وخارج الخلية وتفاعلات التبادل. وإن أمكن، تعرف التفاعلات الفريدة بأنها إجمالي عدد التفاعلات غير الموجودة في أية تفاعلات محفزة بواسطة الأيزوإنزيم، حيث تتساوى الكيمياء الكمية للتفاعل.

ب) إجمالي الأيض كما حدده المؤلفون، يشمل كل المتفاعلات، والنواتج، والعوامل المساعدة والمحفزات والمركبات الوسيطة الموجودة في أي تفاعل كيميائي رياضي. وتعرف نواتج الأيض الفريدة بأنها الفريدة في التركيب الكيميائي، حيث يمكن أن يوجد جزء من نواتج الأيض ذو تركيب كيمياتي مماثل في عدة تقسيمات.

ج) يشمل عدد الجينات في النموذج في معظم الشبكات المهيكلة، كما يعرف بإطارات القراءة المفتوحة (ORFs) التي تنتج منتج للجين الذي يحفز تفاعل كيميائي رياضي محدد. ومع ذلك، تشمل عدة هياكل فقط منتج الجين (على سبيل المثال الإنزيمات) دون أي ارتباط مع إطار القراءة المفتوحة.

د) في معظم الشبكات المهيكلة يتم توضيح النسبة المئوية للجينوم المسلسل بالنموذج المقدم. ويتم حساب نسبة الجينوم المغطاة اعتماداً على إجمالي عدد إطارات القراءة المفتوحة من الكائن المسلسل الأصلي، وإجمالي الجينات الموجودة في الهيكلة. وقد تختلف القيم قليلاً عن المرجع الأصلي للشبكات المهيكلة في حالة تم تحديث الجينوم المسلسل للكائن.

هـ) في معظم الشبكات المهيكلة فإن التقسيمات يتم استخدامها. ومع ذلك، فإنه في عدة نماذج لم تذكر التقسيمات، ولذلك، يعطى هنا إيضاح لهذا العامل اعتماداً على فحص النموذج.

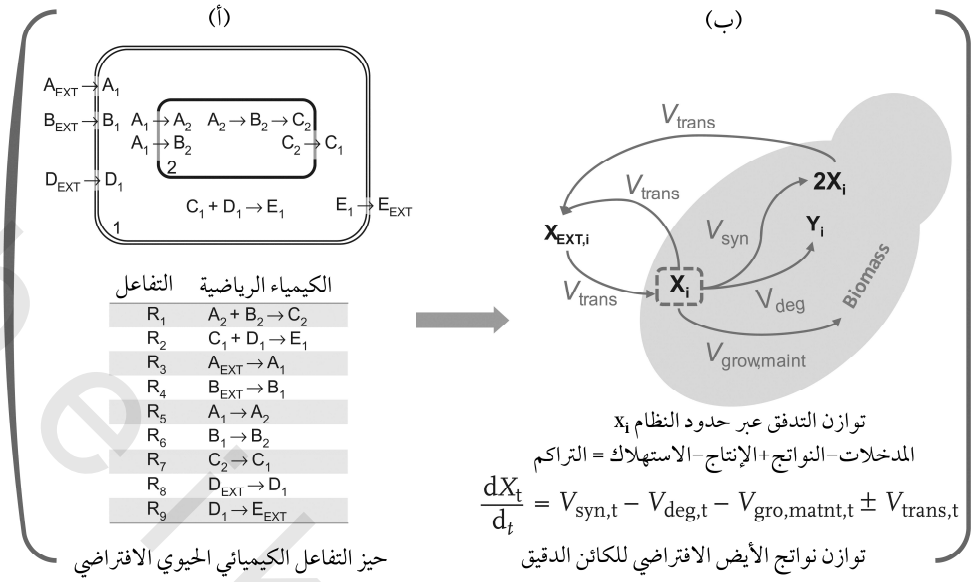
و) إن التسمية المشتركة المستخدمة في تحديد النموذج هي الاسم الأول–الاسم الأخير –عدد إطارات القراءة المفتوحة المقدمة. وفي عدة حالات كان هناك انحرافاً عن هذه التسمية، ويعطي اسم النموذج المستخدم في المرجع الأصلي من أجل التناسق.

ز) تم سلسلة جينوم سلالة أسبرجيلس نيجر ATCC9029، مع تغطية ثلاثية بواسطة شركة الجينومات المتكاملة (شيكاغو، الولايات المتحدة الأمريكية)؛ ومع ذلك، فإن تسلسل الجينوم ليس متاحاً حالياً للجمهور.

ح) تم سلسلة جينوم سلالة أسبرجيلس نيجر ATCC9029 بواسطة قسم الطاقة، معهد الجينومات المشتركة؛ ومع ذلك، لم يسجل هذا التسلسل حالياً على أنه مكتمل.

ط) لم يستند هذا النموذج المهيكل على تسلسل الجينوم، ولكنه اشتمل بدلاً من ذلك على تحليل شبكات البروتيومات المهيكلة لميتوكوندريا الإنسان.

obeikandl.com



الشكل رقم (٥ , ٢). حيز التفاعل الكيميائي الحيوي كما وصف في النص.

يوضح الشكل رقم (٥ , ٢) كلاً من حيز تفاعل كيميائي حيوي مفترض (أ) وتوازن أيض مفترض للكائن (ب). ويتم اقتراح حيز تفاعل كيميائي حيوي مكون من جزئين في (أ)، مع نواتج أيض فريدة A، B، C، D، E، وتعدُّ في شبكة لتفاعلات النقل المتبادل، وتفاعلات التحفيز، وتفاعلات النقل الداخلي. ويتم تعريف تفاعلات التحفيز في هذا السياق على أنها تفاعلات أيض بنائية أو هدمية، وتشمل تفاعلات النقل الداخلي. ويمكن أن يكون هذا بسبب أنه في حين يكون A_1، A_2 نواتج أيض متطابقة كيميائياً (على سبيل المثال، يعدُّ ناتج الأيض A ناتج أيض واحد وفريد)، ومن أجل النمذجة يتم اعتبارها نواتج أيض مستقلة، ويساوي نقل A من الجزء ١ (A_1) إلى الجزء ٢ (A_2) تحويل A_1 إلى A_2. ولذلك يتم اعتبار R_1، R_2، R_5، R_6، وR_7 في الحقيقة تفاعلات أيضية. ويتم عند ذلك اعتبار التفاعلات R_3، R_4، R_8، وR_9 تفاعلات نقل متبادل، حيث يدخل ناتج الأيض الخارجي (A_{EXT}) إلى النظام. وفي (b) يتم وضع المبادئ المطبقة على حيز التفاعل الكيميائي الحيوي النظري في إطار سياق الأيض الخلوي. ويؤخذ توازن التدفق ($V_{n,i}$) عبر ناتج الأيض X_i في الاعتبار، وتشمل أربعة تدفقات حاسمة: تدفقات النقل ($V_{trans,i}$)، تدفقات التخليق ($V_{syn,i}$)، تدفقات التحليل ($V_{deg,i}$)، وتدفق يمثل نضوب ناتج الأيض X_i لتلبية متطلبات النمو والاستمرار ($V_{gro,maint,i}$). ويمكن تلخيص هذه التدفقات لتحديد تراكم ناتج الأيض X_i خلال حدود النظام بالنسبة للزمن. ومع ذلك، فإنه بالنسبة لمعظم تطبيقات تحليل توازن التدفق عادةً ما تكون مستويات الزمن للتغير الديناميكي في تجمعات نواتج الأيض أسرع بدرجة كبيرة من مستويات الزمن المرتبطة بالنمو، ولذلك، عادةً ما يتم افتراض وجود حالة ثبات (dX_i/dt = صفر).

obeikandl.com

وفي إعادة هيكلة شبكة الجينوم فإن كل من هذه التفاعلات يتم توضيحه بصورةٍ أشمل عن طريق تحديد دالة لإطار قراءة مفتوح محدد (ORF)، وعليه يتم إعادة تركيب قائمة مفصلة لكافة التفاعلات ونواتج الأيض وإطارات القراءة المفتوح المحددة لها، بما في ذلك تعريف تلك التفاعلات ونواتج الأيض الفريدة (على سبيل المثال بصورةٍ مستقلة عن التقسيم تمثل الجوانب الكيميائية الجديدة وتفاعلاتها الهدمية أو البنائية). وتشتق الطريقة التي يتم تطبيقها بعد ذلك من المبادئ الكلاسيكية للهندسة الكيميائية، حيث يتم أساساً إجراء توازن للكتلة عبر حدود نظام معرفة. (ملاحظة: في إطار التعليم الحديث، يرتبط توازن الكتلة والطاقة عادةً بمجال الهندسة الكيميائية؛ ومع ذلك، فمن منظور الأحياء ينشأ تحليل توازن التدفق من التوصيف الإنزيمي المبكر وتحليل المسارات الكيميائية الحيوية، كما نوقش أعلاه. ومن الناحية التاريـخية فإنه من الضروري ذكر أن توازنات الكتلة والطاقة تنبع من قوانين الكيميائي جون دالتون، والتي تم توضيحها بالتجارب المعملية بواسطة الكيميائي ميخائيل لومونوزوف [١١٣]).

ويمكن اعتبار اسلوب توازن الكتلة لمنتج أيض معين من الصورة النوعية:

$$\text{In} - \text{Out} + \text{Generation} - \text{Consumption} = \text{Accumulation} \quad (٢,١)$$

الداخل – الخارج + الإنتاج – الاستهلاك = التراكم

ومن منظور التفاعل الكيميائي الحيوي يمكن تشكيل توازن الكتل أعلاه رياضياً إلى التعبير:

$$\frac{dX_i}{dt} = V_{syn,i} - V_{deg,i} - V_{gro,maint,i} \pm V_{trans,i} \quad (٢,٢)$$

في المعادلة (٢,٢) يتم تعريف تراكم ناتج الأيض X_i بالنسبة للزمن على أنه معدل التخليق ($V_{syn,i}$) ناقص معدل التحليل ($V_{deg,i}$) ناقص معدل الاستهلاك المرتبط بالنمو أو الحفاظ على الكتلة الحيوية الموجودة ($V_{gro,maint,i}$)، وبعد ذلك جمع أو طرح معدل النقل ($V_{trans,i}$) عبر حدود بيولوجية محددة (على سبيل المثال، الغشاء). وقد يمكن بعد ذلك كتابة المعادلة (٢,٢) الموجودة في صورة عددية، بطريقة مصفوفة، لتنتج المعادلة (٢,٣).

$$\frac{dX}{dt} = S \cdot V \pm V_{trans} \quad (٢,٣)$$

وتمثل المعادلة (٢,٣) توازن الكتلة خلال كل نواتج الأيض في حيز التفاعل الكيميائي الحيوي المأخوذ في الاعتبار، ذات التركيز X، ثم تحديد عامل لكل التفاعلات الأيضية، V، ومصفوفة كيميائية رياضية، S. وعادةً ما تكون مستويات الزمن البيولوجية المرتبطة بالتغيرات في تركيزات نواتج الأيض سريعة جداً، وأسرع بصورةٍ أكبر من مستويات الزمن المرتبطة بالنمو (على سبيل المثال زمن التضاعف للسكاروميسيس سيرفيسي حوالي ساعتين).

obeikandl.com

ولذلك فمن المنطقي افتراض أن تركيزات كل نواتج الأيض داخل الخلية تكون في حالة ثبات، مما يعطي المعادلة (٢ , ٤):

$$0 = \mathbf{S} \cdot V \pm V_{trans} \qquad (٢ , ٤)$$

ويمكن تبسيط المعادلة (٢ , ٤) أكثر بالأخذ في الاعتبار أنه يمكن خفض معدل نقل جميع نواتج الأيض، X، إلى قيمة ثابتة تساوي مجموع نقل نواتج الأيض إلى أو خارج حيز التفاعل الحيوي. وهذا التبسيط يحول (V_{trans}) إلى ثابت، b، وهو عامل يمثل محصلة تبادل تدفق نواتج الأيض. ويعبر عن هذه القيمة الثابتة، b، لكل ناتج أيض، في صورة مصفوفة في المعادلة (٢ , ٥)، مع توضيح استخدام مصفوفة الهوية، I.

$$0 = \mathbf{S} \cdot V + \boldsymbol{b} \cdot \mathbf{I} \qquad (٢ , ٥)$$

وقبل المزيد من التبسيط، فإنه من المناسب أخذ المعادلة (٢ , ٥) وتطبيقها على النظام الموضح في الشكل رقم (٢ , ٥). ويوجد أدناه المصفوفة الكيميائية الرياضية، S، والعامل الذي يصف كل التفاعلات الأيضية، V، في المعادلة (٢ , ٦). وعلاوةً على ذلك، فقد تم تمثيل العامل، b، الذي يمثل محصلة تبادل تدفقات كل ناتج أيض في المعادلة (٢ , ٦) (لغرض التبسيط فإن مصفوفة الهوية غير مدرجة حيث إن b.I= b). ولغرض التوضيح، فإن الصف العلوي لكل مصفوفة يعمل كرأس عمود. وفي حالة العامل b، فبينما تم تحديد كل نواتج الأيض، فإن بعض نواتج الأيض فقط لها مجموع نقل، المعرف سابقاً كـ R_3، R_4، R_8، وR_9. ويتم تحديد نواتج الأيض تلك مع تفاعل النقل المقابل (R_n) كما هو موضح بالشكل رقم (٢ , ٤).

$$\begin{vmatrix} \boldsymbol{A_1} & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ \boldsymbol{B_1} & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ \boldsymbol{C_1} & 0 & -1 & 0 & 0 & 1 \\ \boldsymbol{D_1} & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ \boldsymbol{E_1} & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ \boldsymbol{A_2} & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ \boldsymbol{B_2} & -1 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ \boldsymbol{C_2} & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{vmatrix} \bullet \begin{vmatrix} \boldsymbol{R_n} \\ R_1 \\ R_2 \\ R_5 \\ R_6 \\ R_7 \end{vmatrix} + \begin{vmatrix} \boldsymbol{b_n} \\ (R_3)A1 \\ (R_4)\ B_1 \\ C_1 \\ (R_8)\ D_1 \\ (R_9)\ E_1 \\ A_2 \\ B_2 \\ C_2 \end{vmatrix}$$

$$\boldsymbol{S} \quad \bullet \quad \boldsymbol{V} \quad + \quad \boldsymbol{b} \quad = \quad 0 \qquad (٢ , ٦)$$

ويمكن إعادة ترتيب المعادلة (٢ , ٥)، وخاصةً مع التركيز على فصل نواتج الأيض التي لها محصلة تبادل تدفق. وتم هذا بالفعل عن طريق تعريف عامل جديد، b_t، والذي سوف يشمل فقط صفوف نواتج الأيض التي لها محصلة تبادل تدفق (على سبيل المثال، لا يتم نقل كل نواتج الأيض عبر حدود النظام). وعليه، سوف يتم خفض أعمدة مصفوفة الهوية لنفس عدد الصفوف مثل العامل b_t، وتسميته I_t. وعلاوةً على ذلك، يمكن تقسيم المصفوفة

الكيميائية الرياضية، S، لتشمل الكيمياء الرياضية للتفاعلات المرتبطة بالهدم أو البناء الأيضي الأمر الذي ينتج عنه محصلة تراكم أو نقل لناتج الأيض، المعرف بالـ S_r، وإلى تفاعلات تشكل تكوين واستمرار الكتلة الحيوية، المعرف بالـ $S_{b,m}$. وأخيراً تتم معاملة مصفوفات الكيمياء الرياضية المعدلة بواسطة عوامل التدفق المقابلة، $V_{b,m}$ و V_t. وأدناه توجد المعادلة النهائية الناتجة (٢ , ٧).

$$0 = \mathbf{S}_r \cdot \boldsymbol{V}_r + \mathbf{S}_{b,m} \cdot \boldsymbol{V}_{b,m} + \boldsymbol{b}_t \cdot \mathbf{I}_t \qquad (٢ , ٧)$$

وباستخدام توضيح للمصفوفة أكثر ألفةً، يمكن إعادة صياغة المعادلة (٢ , ٧) إلى المعادلة (٢ , ٨):

$$\begin{aligned} \mathbf{S}' &= \langle \mathbf{S}_r | \mathbf{S}_{b,m} | \mathbf{I}_t \rangle \\ V' &= \begin{matrix} \boldsymbol{V}_r \\ \boldsymbol{V}_{b,m} \\ \boldsymbol{b}_r \end{matrix} \\ \mathbf{S}' \cdot V' &= 0 \end{aligned} \qquad (٢ , ٨)$$

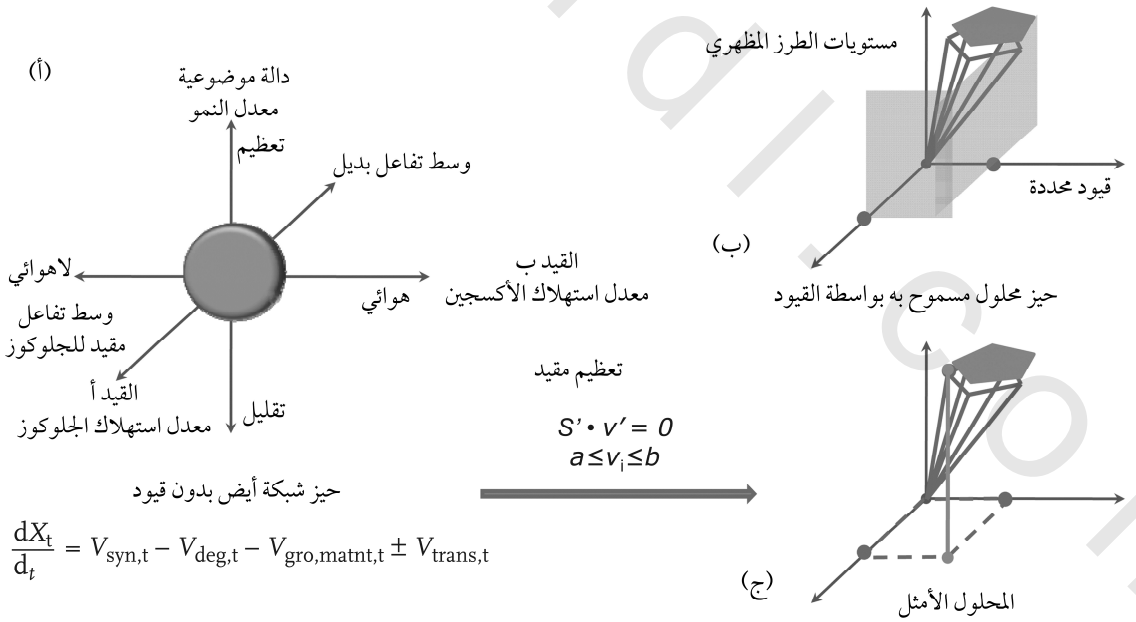
والصورة أعلاه (٢ , ٨) هي الأكثر استخداماً في المراجع لتوضيح توازن التدفق لحيز تفاعل حيوي معرف كيميائياً ورياضياً، وهي مماثلة لما هو موجود في الشكل رقم (٢ , ٥). وبعد هذه النقطة، يتم تضمين قيود إضافية والتي عادةً ما تكون خاصة بحيز التفاعل الحيوي المأخوذ في الاعتبار. وسوف تشمل هذه الاعتبارات، ولن تكون مقصورة على تقسيم ناتج الأيض والتفاعل، انعكاسية التفاعلات، ومحصلة معادلة الكتلة الحيوية (على سبيل المثال، محصلة جميع مرادفات نواتج الأيض، والعوامل المساعدة في الاختزال والأكسدة، والعوامل المساعدة للطاقة في كميات كيميائية رياضية)، والحد الأدنى والأقصى النظري لتدفقات نواتج الأيض، والحد الأدنى والأقصى لمعدلات النمو، كمية الـ ATP (أو وحدات الطاقة المكافئة) المطلوبة للاستمرار، وكمية التدفقات الأولية لتدفقات تبادل المدخلات (على سبيل المثال، معدل استهلاك الجلوكوز). وأخيراً، يجب تحديد دالة موضوعية، لكي يتم تعظيمها أو تقليلها، وعادةً ما تأخذ صورة المعادلة (٢ , ٩)، حيث تكون Z هي دالة موضوعية تساوي محصلة منتج عامل الوحدة، q_i، والتدفقات الأيضية، V_i، حيث تكون q_i عادةً هي تدفق معدل النمو أو معدل استهلاك الجلوكوز. ويعمل كل من هذه التدفقات كعوامل تعظيم مناسبة لنمذجة الأيض داخل الخلية حيث يقترب معدل النمو الخاص للميكروبات، μ، من μ_{max}، تحت ظروف زيادة المواد المغذية ومحدودية وسط التفاعل. ولاحظ أن المعادلة (٢ , ٩) تشمل قيود نواتج الأيض، V_i، والتي عادةً ما تتراوح من قيمة صغرى (a) إلى قيمة عظمى (b):

$$\begin{aligned} Z &= \sum \boldsymbol{q}_i \cdot \boldsymbol{V}_i \\ a &\le \boldsymbol{V}_i \le b \end{aligned} \qquad (٢ , ٩)$$

obeikandl.com

ويمكن حل نظام المعادلات الخطية الناتج، لدالة موضوعية معينة، باستخدام طرق البرمجة الخطية، والتي تتوفر لها عدة إجراءات حل رقمية. ويكون الناتج هو حيز حل والذي يمكن تمثيله على الأقل ببعدين أو على الأكثر بثلاثة أبعاد، والتي يتم من خلالها تعريف حيز النمط الظاهري. ويوضح الشكل رقم (٦ , ٢) ما يعرف عادةً بمستوى النمط الظاهري (PhPP)، حيث يستخدم حيز حل ثنائي أو ثلاثي الأبعاد للمحاكاة حيث يؤخذ تعظيم دالة موضعية في الاعتبار تحت قيود معينة، مثل تعظيم معدل النمو في ظل ثبات معدل استهلاك الجلوكوز (q_{gluc})، واستهلاك الأكسجين (q_{O2}).

يعد الشكل رقم (٦ , ٢) ملخصاً لمستويات النمط الظاهري التي تنتج من تحليل توازن التدفق، والذي له أصول في تأدية توازن الكتلة الثابت لنواتج الأيض عبر حدود نظام محددة. وكما هو موضح في الشكل رقم (٦ , ٢ أ)، فإنه يمكن رسم شبكة الأيض المعاد هيكلتها الناتجة في بعدين أو ثلاثة أبعاد. ويمثل المحور y دالة موضوعية، والتي يمكن تعظيمها أو تقليلها، في حين يمثل البعدين الآخرين (z, x) قيود التدفق. وتشمل القيود الشائعة معدلات استهلاك الجلوكوز والأكسجين، والتي سوف تخلق حيز حل مقيد، حيث يمكن تعظيم الدالة الموضعية، عادةً معدل النمو، كما هو موضح في الشكل رقم (٦ , ٢ ب). ويؤدي مستوى النمط الظاهري الناتج (الشكل رقم ٦ , ٢ ج) إلى حل مثالي والذي يلائم خصائص التعظيم.



الشكل رقم (٦ , ٢). تحليل توازن التدفق ومستويات النمط الظاهري.

وقد تم تطبيق المنهج الموصوف هنا في تحليل توازن التدفق لعدة كائنات كما هو موضح في الجدول رقم (٢,٤)، وقد عمل بصفةٍ خاصة كأداة أساسية في مناهج الهندسة الأيضية، وحديثاً في بيولوجيا الأنظمة. وبيولوجيا الأنظمة هو التوصيف الكمي لاستجابة المسارات الوراثية والتعبيرية والبروتينات والأيض والإشارات والمسارات المعلوماتية الأخرى وتفاعلها مع الاضطرابات المحددة بوضوح في نظام حيوي. ويمكن أن يكون الاضطراب في شكل محفز وراثي أو كيميائي أو بيئي. ويوجد في قلب بيولوجيا الأنظمة تحويل مجموعات البيانات الكمية، عادةً على المستوى الكبير، إلى النماذج الحاسوبية التي تقدم كلاً من التفسير والتوقع. وتوفر الـ GSMMs إطاراً لكيفية تنظيم بيانات الأوميات ووضعها في شبكة أيضية. وبعدما أصبحت التقنيات متاحة لقياسات الترانسكريبتوم (مصفوفات أوليجونيوكليوتيدات الدنا والدنا الحلقي)، البروتيومات (الفصل الكهربي الموازي بالهلام ثنائي الأبعاد مع تحليل الكتلة الطيفي أو الكتلة الطيفي المباشر)، الفلوكسومات (الوسائط المعلمة بالنظائر المشعة والتعيين بواسطة تحليل الكتلة الطيفي والفصل اللوني الغازي)، والميتابولومات (عدة طرق تحليلية تشمل تحليل الكتلة الطيفي والفصل اللوني السائل والغازي)، فقد تم الحصول على مجموعات هائلة من البيانات والتي تتطلب تطوير المعلومات الحيوية والنماذج الكمية لتحليل وتفسير وتوقع المعلومات. وبدأت التقنية الحيوية الصناعية في استغلال فوائد هذه الأدوات والتعرف على إستراتيجيات الهندسة الأيضية لتطوير العمليات المحسنة بدايةً باستخدام البرامج الحاسوبية، وإنتاج قائمة محدودة من الاضطرابات الوراثية ذات احتمالية نجاح كبيرة والتي يجب تقييمها عملياً. وتكون العملية شديدة التكرار، مع هيكلة وتوصيف السلالة موفرةً بيانات أوميات جديدة والتي يمكن أن تستخدم لتحسين النماذج (على سبيل المثال، ضبط الجودة المعملية باستخدام البرامج الحاسوبية) وإستراتيجيات الهندسة الأيضية (الشكل رقم ٢,٢).

(٢,٧) دراسات حالة لبيولوجيا الأنظمة الصناعية Industrial Systems Biology Case Studies

كانت هناك دراسات ومراجع موسعة مكثفة تصف التقنية الحيوية الصناعية، وتوضح عدة دراسات حالة مميزة [٧٣، ٧٥، ١١٤-١١٥]. وكما تم اقتراحه مسبقاً، تتوفر بيولوجيا الأنظمة الصناعية في صورتين: تبني الشركات الموجودة بنيتها التحتية من خلال إعادة هيكلة الكفاءات الداخلية أو تكوين مجموعات جديدة ذات قدرات وخبرات في بيولوجيا الأنظمة الصناعية لتطوير العمليات، أو تجذب المتخصصين في تطوير العمليات من الخارج إلى هيئات صغيرة حديثة التكوين، والتي تتخصص في بيولوجيا الأنظمة الصناعية. وتشمل أمثلة هذه الشركات التي ركزت على توفير خبرات بيولوجيا الأنظمة الصناعية لمجموعات تطوير العمليات التقليدية METabolic EXploere (فرنسا، أنشئت عام ١٩٩٩م)، Genomatica (الولايات المتحدة الأمريكية، أنشئت عام ٢٠٠٠م)، Fluxome Sciences

(الدنمارك، أنشئت عام ٢٠٠٢م)، و Microbia Precision Engineering (الولايات المتحدة الأمريكية، وهي نابعة من Ironwood Pharmaceuticals، سابقاً Microbia). وعلى الرغم من صغر هذه الشركات، إلا أنها تمتلك تعاونات هائلة مع الكثير من الشركات الكبرى لتصنيع الكيماويات، والدوائيات، والبتروكيماويات.

وقد كان لعلم بيولوجيا الأنظمة الصناعية، خلال نشأته، الأثر الكبير على المنتجات الملموسة المنتجة باستخدام التقنية الحيوية الصناعية. وعلى الرغم من إمكانية تقديم عدة منتجات كدراسات حالة، فإن السياق الأكثر مناسبةً لتحديد تأثير بيولوجيا الأنظمة الصناعية هو اعتبار ثلاث فئات من المنتجات الأكثر شمولاً: (١) منتجات ناضجة ومطورة (مثل الإيثانول الحيوي)، (٢) منتجات حديثة وسريعة التطور (على سبيل المثال، ٣،١- بروبان دايول)، و(٣) منتجات قيد التطوير (مثل حمض السكسينيك). وقد تأثرت كافة تلك المنتجات المقدمة كأمثلة بشكلٍ كبير بتطبيق بيولوجيا الأنظمة لتطوير مصانع الخلايا الميكروبية بصورةٍ تجارية.

(١,٧,٢) منتج تقني حيوي صناعي ناضج ومطور: الإيثانول الحيوي

A Mature and Developed Industrial Biotechnology Product: Bioethanol

كما تم توضيحه مسبقاً، فإن الإيثانول الحيوي هو أكبر منتج للتقنية الحيوية الصناعية في العالم من حيث الإنتاجية الكمية وإجمالي المبيعات، والذي يتوسع بشكلٍ كبير بواسطة الدعم المؤسسي والاجتماعي والسياسي غير المسبوق [١٠]. في عام ٢٠٠٧م، زاد إجمالي عدد المصافي الحيوية التي تنتج الإيثانول الحيوي في الولايات المتحدة الأمريكية من ١١٠ تعمل في ١٩ ولاية إلى ١٣٩ في ٢١ ولاية. وفي العام نفسه، ازدادت سعة الإنتاج السنوية بحوالي ٧,٦ مليار لتر تقريباً لتصل لقدرة إجمالية سنوية في الولايات المتحدة الأمريكية تقدر بـ ٢٩,٩ مليار لتر، مما يمثل أعلى نسبة من إجمالي قدرة الإنتاج العالمية المقدرة بـ ٤٩,٦ مليار لتر. وفي ١٩ ديسمبر ٢٠٠٧م، طبقت الولايات المتحدة قانون أمن واستقلال الطاقة لعام ٢٠٠٧م، الذي يعد امتداداً لمعيار الوقود المتجدد التي تم سنها في إطار قانون سياسة الطاقة لعام ٢٠٠٥م. ويفترض التشريع الذي تم تطبيقه مؤخراً حدوث التطبيق الإجباري للوقود الحيوي المتجدد بين عامي ٢٠٠٨-٢٠٢٢م، في حين يجب أن تنمو منتجات إجمالي الوقود المتجدد الإجباري من ٣٤,١ إلى ١٣٦,٣ مليار لتر، على التوالي. وبالإضافة إلى ذلك، يجب أن ينتج ١٣٦,٣ مليار لتر من الوقود المتجدد من ٤١,٦٪ من الوقود الحيوي المتجدد و٥٨,٣٪ من الوقود الحيوي المتطور، ويتعين أن يشتق على الأقل ٤٤٪ أو ٦٠,٦ مليار لتر من الوقود الحيوي المطور من الكتلة الحيوية السليولوزية [١١٦]. وفي المستقبل القريب، فسوف يستمر الإيثانول الحيوي في التوسع كمنتج التقنية الحيوية الأكثر نضوجاً وتطوراً، مع الطلب غير المحدود على إستراتيجيات الهندسة الأيضية المتطورة وتطبيقات أدوات بيولوجيا الأنظمة لتحسين كل قطاعات تطوير عملية الإيثانول الحيوي.

يستخدم منتجي الإيثانول الحيوي مجموعة من منصات التخمير؛ ومع ذلك، فإن السكاروميسيس سيرفيسي تعد من بين الأكثر شهرة لثباتها في عمليات التخمير على المستوى الكبير (>٣٠٠٠٠٠ لتر). وقد تم الإعلان عن أول نموذج أيض على مستوى الجينوم للخلايا حقيقية النواة في السكاروميسيس سيرفيسي في ٢٠٠٣م [٢٠]. ويمكن أن تتوقع إعادة هيكلة شبكة الجينوم، باستخدام بيئة تخليقية بسيطة نسبياً بـ ٨٨٪ من أنماط النمو الظاهرية بشكلٍ صحيح. وفي تقييم آخر، تم استخدام نفس نموذج شبكة الأيض لإنتاج تحليل مستوى نمط ظاهري (PhPP) يصف حالات أيض الخميرة عند مختلف مستويات توفر الجلوكوز والأكسجين [١١٧]. وقد أدى فحص الـ PhPP للسكاروميسيس سيرفيسي إلى تعريف خطين من المثالية: خط مثالية النمو، الذي يمثل الإنتاج الأقصى للكتلة الحيوية خلال النمو الهوائي محدود الجلوكوز، وخط مثالية الإيثانول، والذي يمثل كلاً من الإنتاج الأقصى للإيثانول والنمو الأقصى خلال الظروف الهوائية الدقيقة. وقد تم مقارنة هذا التوقع للـ PhPP للسكاروميسيس سيرفيسي ببيانات معملية مستقلة، وأظهرت النتائج توافقاً قوياً بين معدلات النمو الخاصة، والاستهلاك والإنتاج المقدرة حاسوبياً والمقاسة معملية. ولذلك، يمكن استخدام إعادة هيكلة شبكات الأيض والمحاكاة لتوفيق البيانات الموجودة للسكاروميسيس سيرفيسي بصورة نظامية، وخاصةً بعد توسع وإتاحة مصادر الخميرة، وقواعد البيانات، والأدوات للتحليل العالمي لبيانات الجينوم ، مثل قاعدة بيانات جينوم السكاروميسيس [١٦، ١١٨-١٢٠].

وقد تم توضيح استخدام نماذج الأيض لتعظيم إنتاج الإيثانول الحيوي في السكاروميسيس سيرفيسي في دراستين. تم استخدام نموذج بسيط لتوضيح حذف إنزيم الجلوتامات ديهيدروجينيز المعتمد على الـ NADPH، والتعبير المفرط لإنزيم الجلوتامات ديهيدروجينيز المعتمد على الـ NADH، والذي أدى إلى زيادة إنتاج الإيثانول مع تقليل إنتاج المنتج الثانوي الجليسرول بـ ٤٠٪[١٢١]. وفي دراسةٍ ثانية، تم استخدام نموذج الأيض على مستوى الجينوم السابق ذكره لتعريف هدف جديد لتحسين إنتاج الإيثانول الحيوي عن طريق إدخال إنزيم الجليسرالدهيد ديهيدروجينيز المكون للـ NADPH. وقد أدى هذا إلى زيادة تكوين الإيثانول الحيوي مع تقليل تكوين الجليسرول [١٢٢]. وفي كلٍ من هذين المثالين تم تعديل أيض الأكسدة والاختزال، وبصورةٍ عامة فقد ثبت فعالية هذا النهج في تحسين الكثير من العمليات الحيوية، حيث إن عوامل الأكسدة والاختزال الـ NADH والـ NADPH تشارك في عدد كبير من التفاعلات.

ومع شيوع الآليات التجريبية لجمع بيانات الترانسكريبتومات، فإنه يتم حالياً الاهتمام والتركيز على طرق تحليل ودمج البيانات بمجموعات بيانات الأوميات الأخرى. وقد أصبح واضحاً أن بيانات الترانسكريبتومات وحدها، مالم تستخدم في الفحص البيئي أو ضبط الجودة (على سبيل المثال، التأكد من أن الطرز الجيني ينتج الصورة التعبيرية المقابلة)، تقدم تفسيراً بيولوجياً آلياً محدوداً لأساليب الهندسة الأيضية. وقد دمجت عدة دراسات

بيانات الترانسكريبتومات مع الميتابولومات والفلوكسومات [١٨، ١٢٣-١٢٥]. فعلى سبيل المثال تم تعيين طرق التدفق الأولية لوسائط التفاعل ثلاثية الكربون (الجلوكوز، الإيثانول، والجالاكتوز) باستخدام تفاعلات أيض هدمية من نموذج الأيض على مستوى الجينوم للسكارروميسيس سيرفيسي، واستخدمت بعد ذلك في تحليل حذف الجين في الطرز الظاهري. وقد استخدمت تدفقات محكومة التأثير لتوقع نسب تعبير جينات الأيض للنمو في وجود كل وسط تفاعل، مما أدى إلى علاقة ارتباط عالية بين مستويات التعبير النظرية والمعملية لـ ٣٨ جين عند استعمال بيئات الإيثانول والجلوكوز [١٢٦]. ويوضح هذا المثال أن دمج وظائف التعبير والتنظيم في شبكات الأيض للتوقع باستخدام البرامج الحاسوبية يوفر كلاً من النماذج الحيوية المعبرة، ووسائل لربط بيانات الترانسكريبتومات والفلوكسومات.

وفي مثال آخر، تم فحص طبيعة نموذج الأيض على مستوى الجينوم المهيكل للسكارروميسيس سيرفيسي عن طريق ربط بيانات التعبير مع الأيض. وبصفةٍ خاصة، فقد تم تطوير لوغاريتم يمكن من تحديد نواتج الأيض والتي تحدث تغيرات التعبير الأكثر أهمية حولها (يشار إليها بنواتج الأيض المخبرة) [٢٣٠]. وبسبب الطبيعة عالية الارتباط والتكامل للأيض، فإن الاضطرابات الوراثية أو البيئية المدخلة إلى موضع وراثي معين تؤثر في نواتج أيض معينة وتنتشر بعد ذلك خلال شبكة الأيض. وباستخدام بيانات الترانسكريبتومات التجريبية، يمكن توقع نواتج الأيض التي يمكن أن تتأثر، وتعمل كأهداف منطقية للفحص الإضافي والهندسة الأيضية. وقد تم توسيع هذا اللوغاريتم حديثاً ليشمل التفاعلات المخبرة، حيث تم ربط بيانات التعبير بالتفاعلات الأيضية لنموذج شبكة الأيض على مستوى الجينوم للسكارروميسيس سيرفيسي المعاد هيكلتها من أجل تحديد هذه التفاعلات والتي تؤدي الإضطرابات الوراثية أو البيئية حولها إلى مجموعة تغيرات [١٢٧].

كانت هناك عدة أمثلة حيث ساهمت قياسات وتحليل التدفق بشكلٍ كبير في تطوير سلالات إنتاج الإيثانول الحيوي، ولاسيما فيما يتعلق بهندسة تخميرات بهيكلة التخميرات التي تستخدم الزيلوز والبنتوز. وكما تم توضيحه سابقاً، سوف يكون تحويل الإيثانول الحيوي من مصادر الكتلة الحيوية السليولوزية حاسماً في الوفاء بمعايير الوقود المتجدد، ويمثل الزيلوز أحد أكثر أنواع السكر الخماسية استخداماً في الهيميسليولوز، ومخلفات الأخشاب الصلبة والمحاصيل، وثاني أكثر السكريات الأحادية استخداماً بعد الجلوكوز [١٢٨]. وبسبب عدم استطاعة السكارروميسيس سيرفيسي استهلاك السكريات الخماسية بكفاءة، مقارنةً بالجلوكوز، فقد تم إجراء بحوث مهمة في هندسة أيض هذه السلالات. على سبيل المثال، فقد قارن جروتكاير وزملاؤه صور التدفق لسلالتي سكارروميسيس سيرفيسي معدلتين وراثياً، TMB3001 وCPB.CR4، وكلاً منهما تعبر إنزيم الزيلوز ريداكتيز (XR) والزيليتول ديهيدروجينيز (XDH) من بيشيا ستيبيتيس، والزيلوكينيز الأصلي (XK)، ولكن اشتملت سلالة الـ

CPB.CR4 على حذف لجين الـ *GDH1* وتم وضع الـ *GDH2* تحت بادئ *PGK* [١٢٩]. ويؤدي تعبير الـ XR، XDH وXK إلى استخدام غير كفء للزيلوز؛ بسبب عدم توازن عامل مساعد، حيث يجب إنتاج المزيد من الـ NADH بواسطة إنتاج الزيليتول، مما يؤدي إلى تقليل إنتاج الإيثانول. ولذلك فإن الهندسة الأيضية لاستخدام الأمونيا عن طريق حذف إنزيم الجلوتامات ديهيدروجينيز المعتمد على الـ NADPH (*GDH1*)، والتعبير المفرط لإنزيم الجلوتامات ديهيدروجينيز المعتمد على الـ NADH (*GDH2*) أدت إلى زيادة عائد الإيثانول بمقدار ١٦٪؛ بسبب خفض الزيليتول بمقدار ٤٤٪ [١٢٩، ١٣٠]. وباستخدام منهج الهندسة الأيضية العكسية تم استخدام تحليل تدفق الأيض لتوصيف التدفقات داخل الخلية لكلٍ من السلالتين اعتماداً على البيانات المعملية للزراعات المستمرة اللاهوائية باستخدام نمو محدود التغذية بجلوكوز مشعع بالكربون ١٣، مما أكد تحول نشاط الـ XR من اعتماده عادةً على الـ NADPH إلى اعتماده جزئياً على الـ NADH في سلالة CPB.CR4.

علاوةً على ذلك، فقد أوضح التحليل، وبصورةٍ غير متوقعة، تنشيط دورة الجليكوزيلات في سلالة CPB.CR4، منتجاً التساؤل عما إذا كان تنشيط دورة الجليكوزيلات مفضلاً لإنتاج الإيثانول. وقد أمكن فقط، بواسطة قياسات وتحليل التدفق اعتماداً على شبكة أيض مهيكلة مختزلة، التأكد من أن توزيع الكربون قد تم تغييره عن طريق الوراثة الاستهدافية.

في مثالٍ منفصل يعالج مسألة توازن الأكسدة والاختزال الناتجة من تخمير الزيلوز مرةً أخرى، تم استخدام تحليل تدفق الأيض لتوقع أن تنشيط مسار الفسفوكيتولوز (PKP)، والذي يؤدي إلى محصلة إعادة أكسدة الـ NADH لكل زيلوز محول إلى الإيثانول، يمكن أن يكون مفضلاً [١٣١]. ويحول الـ PKP الزيلوز خماسي الفوسفات إلى أسيتيل فوسفات وجليسرالدهيد ثلاثي الفوسفات، مما يتيح العائد النظري الأقصى وهو ٠,٥ جم إيثانول/ جم زيلوز بدون التأثير على نسبة استهلاك الـ NADPH/NADH في تفاعل الـ XR. وقد تمت إعادة هيكلة PKP وظيفي في السلالة TMB3001c وتمت زيادة عائد الإيثانول بمقدار ٢٥٪ نتيجة تقليل تكوين الزيليتول؛ ومع ذلك، فقد توقع تحليل تدفق الأيض أن فقط ٣٠٪ من التدفق الأمثل المطلوب؛ لمنع تراكم الزيليتول والجليسرول يكون موجوداً. ومع ذلك، فقد أدت زيادة التعبير المفرط للـ PKP إلى زيادة معدل استهلاك الأسيتات وتقليل معدل استهلاك الزيلوز، مما حفز الباحثين لزيادة تعبير إنزيم الأسيتالدهيد دهيدروجينيز *ald6*. وقد قلَّل هذا من تكوين الأسيتات، وأنتج سلالة ذات عائد إيثانول أعلى بـ ٢٠٪ ومعدل استهلاك زيلوز أعلى بـ ٤٠٪ مقارنةً بالسلالة الأصلية [١٣٢].

ويخدم تحليل تدفق الأيض غرضين: التحديد البديهي لأهداف الهندسة الأيضية المفضلة والتأكيد المعملي لتوزيعات تدفق الكربون، وكلاً منهما غير ممكن اعتماداً على الفحص البصري للمسارات الكيميائية الحيوية.

وهناك الكثير من أمثلة تكامل مختلف تقنيات الأوميات مع إعادة هيكلة الأيض الميكروبي على مستوى الجينوم لشرح الطرز الظاهرية غير المفهومة سابقاً، أو للتوقع الجديد لإستراتيجيات الهندسة الأيضية في سياق تطوير عملية الإيثانول الحيوي [١٠، ١٣٣].

(٢,٧,٢) منتج تقني حيوي صناعي حديث وسريع التطور: ٣،١-بروبان دايول

A Recently Launched and Rapidly Growing Industrial Biotechnology Product: 1,3-Propandiol

إن ٣،١-بروبان دايول، المنتج بواسطة منصة التقنية الجديدة لشركة دوبونت، شركة دوبونت للمواد القائمة على المصادر الحيوية، والمسمى Bio-PDO™، هو مثال لمنتج حديث، والذي كان ينتج في السابق بواسطة التحويل البتروكيميائي، ويتم توفيره حالياً بواسطة التقنية الحيوية الصناعية. يعد الـ PDO مركب وسيط حاسم في إنتاج حمض التيريفيثالك وبوليمرات الـ PDO، المستخدمة عادة في صناعات القماش والألياف والسجاد، ويعمل كمركب وسيط في منصة دوبونت الجديدة للـ Sorona®. وقد تشاركت دوبونت مع شركة تات وليلي لإنتاج الـ PDO الحيوي باستخدام منصة تخمير خاصة اعتماداً على تحويل إيشيريشيا القولون للـ دي-جلوكوز إلى داي هيدروكسي أسيتون فوسفات (DHAP)، ثم إلى جليسرول وفي النهاية إلى الـ PDO.

وقد تم اكمال تطوير مصنع الخلايا الميكروبية بالتعاون مع شركة جينيكور الدولية. (ملاحظة: كانت جينيكور الدولية، التي أنشئت عام ١٩٨٢م، مشروع مشترك بين جينينتيك وكورننج للزجاجيات (دو كورننج) وهي مسئولة عن الكثير من الاكتشافات المهمة في تقنية الدنا المعدل. في ٢٠٠٥م استحوذت شركة مكونات الغذاء الدنماركية دانيسكو على جينيكور الدولية). وقد تم استكمال مرافق الإنتاج في عام ٢٠٠٦م وبدأ الإنتاج في نوفمبر ٢٠٠٦م. وباستخدام الذرة كمصدر أولي رئيس، سوف تنتج ٤٥ مليون كجم/ عام بكامل قدرتها [١٣٤].

ويؤدي تقييم الدورة الحياتية لإنتاج بوليمر النيلون ٦ مقابل إنتاج المصدر المتجدد Sorona بالـ Bio-PDO إلى ٣٠٪ أقل في استخدام الطاقة و٦٣٪ أقل في انبعاثات غازات الاحتباس الحراري (بما في ذلك المحتوى القائم على المصادر الحيوية المخزن في المنتج) [١٣٥]. وقد ثبت أن عائلة بوليمرات الـ Sorona، المكونة من الـ Bio-PDO والقادرة بالتالي على حث استجابة التهابية، تكون غير سامة وغير التهابية [١٣٦]. ويقدر الطلب على البوليمرات المكونة من الـ PDO بـ ٥٠٠٠٠٠-١٠٠٠٠٠٠ طن سنوياً [١٣٧].

يعد الـ PDO من بين أحد أقدم منتجات التخمير. وقد تم تعريفه لأول مرة بواسطة أوجست فرويند في عام ١٩٨١م في مزرعة مختلطة لتخمير الجليسرول من الكلوستريديوم باستوريانوم [١٣٨]، وتم تحليله لاحقاً بصورةٍ كمية في مدرسة الميكروبيولوجي في ديلفت [١٣٩] واستمر في شركة إيمس، أيوا [١٤٠]. وقد تم الاستعراض المكثف للعملية البتروكيميائية الأصلية التي تقوم بها شركة شل الكيميائية (قسم من مجموعة شل، هولندا) وشركة

ديجوسا (ألمانيا؛ حصلت دوبونت لاحقاً على عمليتها)، ومسح إنتاج الـ PDO بواسطة الكثير من البكتيريا، بما في ذلك أجناس السيتروباكتر، والكلوستريديوم، والإنتيروباكتر، والكليبسيلا، واللاكتوباسيلاس، وتحليل هندسة التفاعل الحيوي التي تم إجراؤها مبدئياً لتقييم جدوى الإنتاج بالتقنية الحيوية الصناعية للـ PDO [١٣٧، ١٤١–١٤٣]. في الكائنات الأصلية التي تنتج الـ PDO، يكون تكوين الـ PDO؛ نتيجة التخمير اللاهوائي للجليسرول حيث يتم إنتاج زيادة من المكافئات المختزلة في صورة NADH (NAD^+) بواسطة نشاط الجليسرول هيدراتيز (*dhaB1-B3*) متبوعاً بنشاط ١،٣–بروبان دايول أوكسيدوريداكتيز (*dhaT*) [١٣٧]. وبسبب الفائدة الكبيرة لتكلفة استخدام مصادر الجلوكوز الأولية، فقد تم تطوير إستراتيجية هندسة أيضية تتطلب التعبير غير المتماثل للمسارات التي تحتم إعادة توجيه تدفق الكربون من DAHP إلى الـ PDO. ولم توضح التعديلات الوراثية الأساسية التي تم تطبيقها في دعامة بكتيريا من إيشيريشيا القولون أي تراكم للـ PDO وأن التراكم البسيط نسبياً للجليسرول (بالمقارنة بالخلات أو السكسينات)، كما تم تفصليه بواسطة ناكامورا وزملاؤه يشمل:

- التعبير المفرط لإنزيمات الجليسرول–٣–فوسفات ديهيدروجينيز (DAR1) والجليسرول–٣–فوسفات فوسفاتيز (GPP2) غير الأصلية (السكارروميسيس سيرفيسي) لتراكم الجليسرول.
- التعبير المفرط لإنزيم الجليسرول ديهيدراتيز (DAR1) والعوامل التي تعيد تنشيط فيتامين ب١٢ غير الأصلية (الكليبسيلا نومونيا) لتحويل الجليسرول إلى ٣–هيدروكسي بروبيونالدهيد.
- التعبير المفرط لإنزيم الأوكسيدوريداكتيز الأصلي (*yghD*) لإكمال تحويل ٣–هيدروكسي بروبيونالدهيد إلى PDO؛ ومع ذلك باستخدام NADPH في مقابل NADH.
- حذف إنزيمات الجليسرول كينيز (*glpK*)، الجليسرول ديهيدروجينيز (*gldA*)، والترايوزفوسفات أيزوميريز (*tpi*) الأصلية (الضرورية لتعظيم تدفق الكربون من الجلوكوز إلى الـ DHAP، مع أقل اعادة للكربون إلى الجليسرالدهيد–٣–فوسفات، ومن ثمَّ دورة الـ TCA والتنفس.
- التنظيم التقليلي لنظام الفوسفوترانسفيريز الأصلي (PTS) وإنزيم الجليسرالدهيد ديهيدروجينيز (*gap*)، ويستبدل الأول بعملية فسفرة حصرية تعتمد على الـ ATP (نزع الاعتمادية على الفوسفوإينول بيروفات) باستخدام إنزيمات الجالاكتوز بيرميز (*galP*) والجلوكوكينيز (*glk*) الأصلية، وزيادة الأخير بإنزيم *tpi* أصلي معاد هيكلته. وتوفر إعادة هيكلة الـ *tpi* في خلفية الـ *gap* نقطة تحكم تدفق مفيدة.

ويؤدي دمج التعديلات أعلاه، بالإضافة إلى الإستراتيجيات التي ظلت محمية بحقوق الملكية الفكرية، إلى إيجاد إيشيريشيا قولون قادرة تحت ظروف التغذية الدفعية على إنتاج الـ PDO بعائد نهائي ٥١٪ (وزن PDO/ وزن جلوكوز)، وتركيز ١٣٥ جم/ لتر، وإنتاجية ٣,٥ جم/ لتر/ ساعة [١٣٧].

يعد الـ PDO الحيوي من بين قصص النجاح الأولى للهندسة الأيضية والتقنية الحيوية الصناعية في صناعة الكيماويات ذات القيمة المضافة. إلا أنه يجب التأكد من أنه للوصول إلى هذه المرحلة فقد تم هذا على مدار عشر سنوات من التطوير والاستثمار في الموارد المهمة. وبالإضافة إلى ذلك، فإنه استناداً على المراجع المتاحة وعروض المؤتمرات، فإن العملية الموصوفة هنا تطلبت تطويراً هائلاً لتقنية الدنا المعدلة، وتوصيف الإنزيم، وتحليل مسارات إنزيمات التفاعلات الحيوية الكلاسيكي، والتي لم تكن متاحة أثناء التطوير. وعليه، فإن الكثير من أدوات بيولوجيا الأنظمة المتاحة حالياً لم تستخدم خلال مرحلة تصميم وتطبيق إستراتيجية الهندسة الأيضية.

وحالياً، يتم تطبيق النمذجة الأيضية للأيض الميكروبي للـ PDO الحيوي لتأكيد النمط الظاهري المتوقع لتوزيعات التدفق داخل الخلية، ولتحديد الفرص المحتملة للجيل الثاني من إستراتيجيات الهندسة الأيضية. وبصورةٍ خاصة، فقد تم تطوير تحليل تدفق الأيض (MFA) لتمكين القياس الديناميكي لتوزيعات التدفق داخل الخلية باستخدام الجلوكوز المعلم بالنظائر ($1\text{-}^{13}C$) في تخميرات التغذية الدفعية لإيشيريشيا القولون K12 (سلالة تنتج الـ PDO الحيوي بافراط) بنسبة ١:٣ من الجلوكوز المخصب طبيعياً ($U\text{-}^{13}C$). وقد استكملت شبكة أيض مهيكلة تفصيلياً، والتي تشمل ٧٥ تفاعلاً و٧٤ ناتج أيض، وخمسة أوساط تفاعل (الجلوكوز، السترات، الأوكسجين، الأمونيا، والكبريتات)، وخمسة منتجات (PDO، الكتلة الحيوية، ثاني أكسيد الكربون، الخلات، وATP)، و٦٣ ناتج أيض متوازن داخل الخلية [١٤٤].

وقد عانى تحليل تدفق الأيض السابق تطويره من قيود افتراض وجود حالة ثبات من النظائر؛ بسبب مستويات الزمن القصيرة نسبياً لمجموعات تركيز نواتج الأيض داخل الخلية. وقد قام أنتونيفيتز وزملاؤه بتوسيع مجال تحليل التدفق من الحالة الثابتة إلى البيئات المتغيرة بواسطة إستراتيجية نمذجة والتي تطبق مشتقات التحليل الطيفي النظائري، وتحليل تدفق الأيض الكلاسيكي اعتماداً على توزيعات نظائر كتل الأحماض الأمينية التي تم تحديدها عن طريق نمذجة وحدة الأيض الابتدائية (EMU) [١٤٤، ١٤٥]. وفي المرة الأولى تم تحليل التدفقات داخل الخلية بالنسبة للزمن لعملية التغذية الدفعية الصناعية لإنتاج الـ PDO الحيوي، وشملت ٨٢ قياسات غزيرة خلال عشرين نقطة زمنية.

وقد وجد أن توزيعات التدفق داخل الخلية تتغير بكثافة خلال مرحلة التغذية الدفعية، مظهرةً نقصاً في نسبة الانقسام بين تحليل الجلوكوز ومسار البنتوز فوسفات (PPP) من ٧٠/ ٣٠ عند ٢٠ ساعة إلى ٥٠/ ٥٠ عند ٤٣ ساعة، ونقص في التدفق من الجليسرالدهيد-٣-فوسفات إلى ٣-فوسفوجليسرات بحوالي ٢١٪ خلال نفس الفترة الزمنية. وزاد التدفق من الـ DHAP إلى الجليسرول-٣-فوسفات وفي النهاية PDO بحوالي ١٠٪ وظل ثابتاً عند ١٣٢ ساعة. ومع ذلك، فقد تغير خروج الـ PDO بصورةٍ كبيرة حيث زاد من ٧٨ (١٨,٦ ساعة) إلى ١٣٨ (٢٨,٦ ساعة) ثم

انخفض بعد ذلك إلى ١٣٠ (٤٠,٧ ساعة) (تم نسب كل قيم التدفق إلى معدل استهلاك الجلوكوز من ١٠٠). وفي خلال الفترة الزمنية نفسها، فقد ظل مسار إنتاج الطاقة الأولي، تدفق الـ TCA، ثابتاً عند ٤٦.

وتوفر النمذجة الأيضية في حالة تقييمات التدفق وشبكة الأيض المهيكلة التأكد من أن الهندسة الوراثية المعتقد أنها توفر طرزاً مظهرياً مطلوباً تقوم بذلك بالفعل. وبالإضافة إلى ذلك، توفر هذه البيانات فرصة داخل الخلية لتقييم فرص الهندسة الأيضية الإضافية، مثل استهداف التعارض بين خروج الـ PDO وتدفق الـ PDO المكون داخل الخلية. والهدف الآخر المحتمل للهندسة الأيضية هو أن نموذج الأيض لم يكن قادراً على حساب كل محصلة الـ ATP الناتج (١٧٦ فائض تدفق الـ ATP لنسبة P/O من ٠,٣ و١٢٣ فائض تدفق الـ ATP لنسبة P/O من ٢) مقارنةً بتفاعلات استهلاك الـ ATP. ومع معطيات تعديلات إيشيريشيا القولون K12 PTS وحقيقة أن تدفق دورة الـ TCA، المصدر الأولي للـ ATP تحت الظروف الهوائية، ظل ثابتاً، فقد تكون هناك فرصاً لإعادة توجيه فائض الـ ATP لتكوين كتلة حيوية أعلى، مما يزيد بذلك من إنتاجية الـ PDO.

وسوف يستمر إنتاج الـ PDO باستخدام التقنية الحيوية الصناعية في التسارع والنضج، وسيكون من الملائم أن يصل الـ PDO لحالة السلع الكيميائية، حيث يزيد طلب السوق والاستدامة، والتوفير بتكلفة فعالة. بالإضافة إلى ذلك، يجب ملاحظة أنه قد تم محاولة نمذجة الأيض الميكروبي، وخاصةً في صورة تحليل تدفق الأيض، في كائنات الإنتاج الأخرى، مثل الكليبسيلا نومونيا [١٤٦-١٥٠].

(٢,٧,٣) منتج تقني حيوي صناعي قيد التطوير: حمض السكسينيك

An In-Development Industrial Biotechnology Product: Succinic Acid

لقد زادت صناعة الكيماويات العالمية بـ ١٥٪ لتصل إلى إجمالي مبيعات يقدر بـ ٦٦٥,٦ مليار دولار أمريكي بين عامي ٢٠٠٤-٢٠٠٥م، حيث أسهمت الشركات الأوروبية بمقدار ٥٤,١٪ (٣٠٠,٥ مليار دولار أمريكي) [١٥١]. وفي الفترة نفسها ارتفع سعر المواد الخام الأساسية لتصنيع الكيماويات، والبترول الخام بمقدار ٣٠٪ (٣١ دولاراً أمريكياً للبرميل في يناير ٢٠٠٤م إلى ٤١ دولاراً أمريكياً للبرميل في يناير ٢٠٠٥م)، وإذا أخذنا تغير السعر بين ٢٠٠٤-٢٠٠٦م في الاعتبار، فإن زيادة الأسعار تقارب ٨٠٪ (٥٦ دولاراً أمريكياً للبرميل في ٢٠٠٥م). ولم تكن زيادة الأسعار السريعة مدفوعة فقط بزيادة الطلب، ولكن بعدم الاستقرار وتهديدات التوفير.

وقد تم تقدير أن زيادة عشرة دولارات في سعر برميل البترول تزيد التكاليف المتغيرة في الصناعة الكيماوية الأمريكية بمقدار ٢,٦ مليار دولار أمريكي سنوياً [١٥٢]. ولهذا تبحث الصناعة الكيماوية بشكلٍ فعال عن مصادر المواد الخام فعالة التكلفة، وصديقة للبيئة، ومتجددة ومستدامة، والتي لا تمكن فقط من إنتاج وحدات بناء

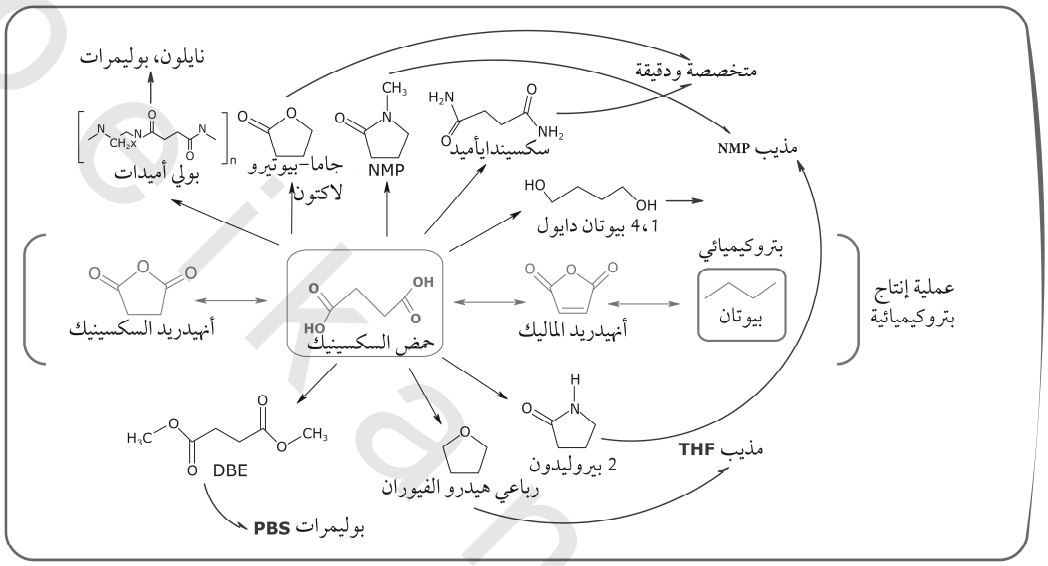
الكيماويات الأساسية، ولكن تعمل أيضاً كمنصة للمنتجات المستقبلية (الشكل رقم ٢,١). وتعد التقنية الحيوية الصناعية بديلاً واعداً مع الكائنات الميكروبية المعدلة لإنتاج المنتجات الأساسية من الكتلة الحيوية.

وفي عام ٢٠٠٤م واستناداً على تحليل نقدي لتحديد أهم وحدات البناء التي يمكن إنتاجها من الكتلة الحيوية ومن ثمَّ تحويلها إلى كيماويات حيوية عالية القيمة، فقد عرفت وزارة الطاقة الأمريكية حمض السكسينيك كأحد أعلى ١٠ وحدات بنائية [١٥٣]. وفي العام نفسه، تم تخليق ١٦٠ مليون كيلو جرام من حمض السكسينيك من التحويل البتروكيميائي لأنهيدريد الماليك (١٠٪ من إجمالي الإنتاج العالمي لأنهيدريد الماليك). وفي حالة شيوع إنتاج حمض السكسينيك على أساس حيوي، فمن المتوقع أن يزيد طلب السوق العالمي إلى ٢ مليار دولار سنوياً مع إجمالي توفير طاقة يقدر بـ ٢٨٠٠٠٠٠ ميجا وات سنوياً. ويستخدم حمض السكسينيك في عدة منتجات ويعمل بصفة مادة بادئة أساسية أو مادة وسيطة في إنتاج الكيماويات المفيدة للمذيبات والبوليمرات.

يوضح الشكل رقم (٢,٧) فرص التخليق الكيميائي المتنوعة التي يوفرها استخدام حمض السكسينيك وأنهيدريد السكسينيك كأحد وحدات البناء الكيميائية. وحالياً يستخدم حمض السكسينيك بشكلٍ أساسي في قطاع الكيماويات المتخصصة ويصل إجمالي الطلب السنوي إلى ١٥٠٠٠ طن، ويتم إنتاجه من تحويل أنهيدريد الماليك. ويتم تخصيص حوالي ١٠٪ من إجمالي أنهيدريد الماليك المنتج (١,٦ مليار كيلو جرام سنوياً) لإنتاج السكسينات. ويستخدم أنهيدريد الماليك بشكلٍ كبير في صناعات الإسكان والإنشاء وتصنيع السيارات، والذي سبب نتيجة زيادة الطلب الأخير عليه زيادة الأسعار من ٠,٩٥ دولار أمريكي للكيلوجرام (٢٠٠٣م) إلى ١,٢١ دولار أمريكي للكيلوجرام (٢٠٠٥م). وقد أدت زيادة الأسعار هذه إلى زيادة مرافق إنتاج أنهيدريد الماليك البتروكيماوي، حيث تستخدم المادة الخام إن-بيوتان. وعليه فقد كان هناك ضغط كبير في الأسعار لتصميم عملية تقنية حيوية صناعية فعالة التكلفة لإنتاج حمض السكسينيك في مواجهة زيادة توفير أنهيدريد الماليك. وتشير التقديرات إلى أن سوق السكسينات تزيد عن ملياري دولار أمريكي سنوياً، مع افتراض إمكانية الحصول على حد أدنى من الإنتاجية يقدر بـ ٢,٥ جم/لتر/ ساعة بواسطة التخمير.

حمض السكسينك ($C_4H_6O_4$، وزن جزئيئ ١١٨,٠٩جم/ مول، pKa_1 ٤,٢١، pKa_2 ٥,٧٢) هو حمض ثنائي الكربوكسيل عديد المجموعات المتأينة ويوجد في الطبيعة. وهو قابل للذوبان في الماء (١٠٠ ملليجرام/ مل) ويعطي محلول رائق عديم اللون. والسكسينات، وهو أنيون لحمض السكسينيك، هي مركب وسيط في دورة حمض الستريك وتنتج من الأكسدة المزدوجة للسكسينيل CoA مع GTP بواسطة الإنزيم المخلق للسكسينيل CoA، وفي معظم الحالات، كمنتج ثانوي لتحويل الأيزوسترات إلى الجليوزلات الذي يتم تحفيزه بواسطة إنزيم أيزوسترات لاييز. ويتأكسد حمض السكسينيك بعد ذلك إلى الفومارات بواسطة إنزيم السكسينات ديهيدروجينيز،

الذي ينتج أيضاً $FADH_2$. وتوجد عدة منصات إنتاج على أساس الكتلة الحيوية، وكلها كائنات بدائية النواة، وتشمل أنإيروبيوسبيريليوم سكسينيبروديسينس، أكتينوباسيلاس سكسينوجينس، سكسينوفيبريو ديكسترينوسولفينس، كورينيباكتيريوم جلوتاميكوم، بريفوتيلا رومينوكولا، وهي بكتيريا معزولة حديثاً من معدة البقر، مانهيميا سكسينيبروديسينس، وإيشيريشيا قولون مهندسة وراثياً لإنتاج حمض السكسينيك بإفراط.



الشكل رقم (٢,٧). حمض السكسينيك – وحدة بناء كيميائية مستدامة.

وقد ناقشت عدة مراجع موسعة سوق حمض السكسينيك بالتفصيل وقد عرضت إستراتيجيات الهندسة الأيضية المختلفة بالتفصيل مع تطبيق بيولوجيا الأنظمة الذي تم استخدامه حتى الآن [١٥٤-١٥٧]. والكائنين الحيين الذين تم هندستهما بصورةٍ كبيرة من العزلات الأصلية هما إيشيريشيا القولون ومانهيميا سكسينيبروديسينس. ولأغراض التوضيح فسوف يتم فقط شرح مانهيميا سكسينيبروديسينس هنا حيث إنها تلخص الإمكانية لبيولوجيا الأنظمة الصناعية.

مانهيميا سكسينيبروديسينس MBAL55E هي بكتيريا سلبية لصبغة الجرام تنمو في وجود ثاني أكسيد الكربون وتم عزلها لأول مرة في عام ٢٠٠٢م من معدة البقر في كوريا، ووجد أنها أصلاً تراكم كميات كبيرة من حمض السكسينيك تحت ظروف تخمير لا هوائية (١٠٠٪ ثاني أكسيد الكربون) ومدعمة بالجلوكوز (٠,٦٨ جم حمض سكينيك/ جم جلوكوز) [١٥٨]. وعقب العزل، تم دراسة التخميرات التقليدية ذات الدفعة الواحدة والمستمرة لمنتجات تحلل الخشب المعامل بهيدروكسيد الصوديوم، مما أدى إلى إنتاجية حمض السكسينيك تقدر بـ ١,١٧ جم/ لتر/ ساعة (عائد = ٥٦٪) و٣,١٩ جم/ لتر/ ساعة (عائد = ٥٥٪)، على التوالي [١٥٩]. وقد كانت

هذه بالتأكيد هي الإنتاجيات الأعلى المذكورة في ذلك الوقت، وكانت واعدة بصفةٍ خاصة باستخدام المواد الخام اللجنوسليولوزية (وقد أجريت أيضاً التجارب الحاكمة باستخدام وسط مختلط من الجلوكوز والزيلوز، والزراعات ذات الدفعة الواحدة أو المستمرة، وأعطت إنتاجيات وعائدات مقاربة).

وفي العام نفسه تم نشر تسلسل الجينوم للمانهيميا سكسينيبروديسينس MBAL55E المحتوي على ٢٣١٤٠٧٨ زوج من القواعد، بالتزامن مع شبكة الأيض المعاد هيكلتها على مستوى الجينوم [١٦٠]. وقد توقعت شبكة الأيض المعاد هيكلتها على مستوى الجينوم، والتي تتكون من ٣٧٣ تفاعلاً (١٢١ تفاعلات قابلة للانعكاس و٢٥٢ غير قابل للانعكاس) و٣٥٢ ناتج أيض، باستخدام تحليل تدفق الأيض، إنتاجاً نظرياً بمقدار ١,٧١ و١,٨٦ مول من حمض السكسينيك لكل مول من الجلوكوز تحت ظروف من ثاني أكسيد الكربون وثاني أكسيد الكربون والهيدروجين، على التوالي [١٦٠]. ونتيجة عمليات المحاكاة، ذكر المؤلفون "استناداً على هذه النتائج، فإننا نصمم الآن إستراتيجيات هندسة أيضية للإنتاج المحسن لحمض السكسينيك؛ وأحد هذه الإستراتيجيات ستكون عن طريق زيادة تدفق كربوكسلة الـ PEP وخفض تدفقات أحماض الخليك، والفورميك، واللاكتيك" [١٦٠].

في عام ٢٠٠٦م صمم المؤلفون سلسلة من طفرات مانهيميا سكسينيبروديسينس MBAL55E والتي شملت تعطيل ثلاثة تفاعلات يتم تحفيزها بثاني أكسيد الكربون (وهي الـ PEP كربوكسيكينيز، والـ PEP كربوكسيليز، وإنزيم الماليك) وتعطيل أربعة جينات مسئولة عن التكوين الثانوي للاكتات والفورمات والخلات (جينات *ldhA*، *pflB*، *pta* و*ackA*) [١٦١]. وأكدت هذه النتائج أنه يمكن الحصول على طفرات قادرة عملياً على عدم تكوين اللاكتات والفورمات والخلات، وأن إنزيم الـ PEP كربوكسيليز كان أكثر أهمية للنمو اللاهوائي وتعظيم إنتاج حمض السكسينيك [١٦١].

وأنتجت سلالة مانهيميا سكسينيبروديسينس LPK7 المهندسة أيضياً تحت ظروف التخمير ذو الدفعة الواحدة ٠,٩٧ مول حمض سكسينيك/ مول جلوكوز، ووصلت تحت ظروف التخمير متعدد الدفعات إلى أقصى تركيز، وإنتاجية، وعائد بـ ٥٢,٤ جم/لتر، و١,٨ جم/لتر/ساعة، و١,١٦ مول حمض سكسينيك/ مول جلوكوز، على التوالي [١٦١]. وناتج الكربون النظري للسكسينات في ظل الخفض الزائد للقوة الاختزالية وكربوكسلة ثاني أكسيد الكربون هو ٢ مول حمض سكسينيك/ مول جلوكوز ($\Delta G^{o'}$ = −٣١٧ نيلو جول/ مول) [١٥٤].

في عام ٢٠٠٦م تم نشر البروتيوم الكامل للمانهيميا سكسينيبروديسينس [١٦٢]. وكان هذا واحداً من الأمثلة الأولى للبروتيومات التي تم تطبيقها لتطوير عملية التقنية الحيوية الصناعية. وباستخدام عملية الترحيل الكهربائي ثنائية الأبعاد مع قياس طيف الكتلة، فقد تم وصف وتعريف وتوصيف ٢٠٠ بروتين موزعين على كافة

البروتينات الخلوية (١٢٩)، وبروتينات الغشاء (٤٨)، وبروتينات مفرزة (٣٠). وتم إجراء تحديد خصائص نمو الخلية ومستويات الأيض إلى جانب قياسات البرويتوم خلال الانتقال من النمو التصاعدي إلى النمو الثابت.

ويمكن استنتاج نتيجتين مهمتين من هذا التحليل وذلك لم يكن ممكناً في السابق. أولاً، أن موضع الجين المشروح مسبقاً على أنه الوحدة الفرعية A للسكسينات ديهيدروجينيز (*sdhA*) من المحتمل أن يكون هو الوحدة الفرعية A للفومارات ريداكتيز (*frdA*) على أساس تحليل البروتيوم المقارن المدعوم بالبيانات الفسيولوجية. ثانياً، تم تعريف إنزيمين جديدين كأهداف هندسة أيضية للتحسينات المستقبلية في إنتاج حمض السكسينيك. *PutA*، *OadA* هي إنزيمات مسئولة عن تكوين الخلات وتحويل الأوكسالوأسيتات إلى بيروفات، على التوالي، وقد يحفز حذفها زيادة في التدفق نحو حمض السكسينيك من خلال تقليل تكوين المنتجات الثانوية [١٦٢]. ويعد هذا مثالاً واضحاً لكيفية أن قياس وتحليل البروتيوم لا يوفر فقط معلومات جديدة لإستراتيجيات الهندسة الأيضية المستقبلية، ولكنه عمل أيضاً كفحص لضبط الجودة لافتراضين أساسيين: أولاً، أن توضيح الجينوم وشرحه خالٍ من الأخطاء، وثانياً، أن تعبير الحمض النووي الريبوزي الرسول mRNA يرتبط مباشرةً بتعبير ونشاط البروتين.

وحديثاً في عام ٢٠٠٧م، تم عرض شبكة معاد هيكلتها محدثة على مستوى الجينوم للمانهيميا سكسينيبروديسينس، والتي شملت ٦٨٦ تفاعل و٥١٩ ناتج أيض على أساس تجارب إعادة الشرح والتحقيق [١٦٣]. وتم التحقق من الشبكة المعاد هيكلتها مع تحليل التدفق على أساس القيود باستخدام البيانات التجريبية المقارنة للحد الأقصى لمعدل النمو الخاص ومعدل تكوين إنتاج الأيض لعدة طفرات من سلالة MBEL55. وفي كل حالات المحاكاة، تم توقع معدل النمو الخاص الأقصى بشكلٍ صحيح، بينما كان معدل إنتاج السكسنيك، بالنسبة لمعدل استهلاك جلوكوز ثابت، متوافقاً بصورةٍ جيدة (بين ٧,٨ و٧,٤ ٣٠٪، اعتماداً على الطرز الوراثي الذي تم محاكاته داخل الخلية). وقد تم استخدام النموذج لتقييم إستراتيجيات حذف الجينات الإضافية التي من المحتمل أن تساعد على تطوير إنتاج حمض السكسنيك، وقد تم مقارنة عمليات المحاكاة مع الإستراتيجيات المذكورة مسبقاً في المحاكاة على مستوى الجينوم لشبكة أيض إيشيريشيا القولون المعاد هيكلتها [١٦٣، ١٦٤]. وأوضح التحليل المقارن لنتائج محاكاة نموذج مستوى الجينوم أن الأثر الإيجابي لحذف الجينات المختلفة على إنتاج حمض السكسنيك كان واضحاً في المانهيميا سكسينيبروديسينس أكثر منه في حالة إيشيريشيا القولون، وأن الأداء الأيضي، المعرف على أنه التدفق الكامل لإنتاج حمض السكسنيك، كان أعلى في المانهيميا سكسينيبروديسينس بسبب معدل استهلاك الجلوكوز العالي الملاحظ تحت الظروف اللاهوائية [١٦٣].

وفي غضون حوالي خمس سنوات (٢٠٠٢-٢٠٠٧م) تم تحويل ميكروب غير معروف سابقاً من المانهيميا سكسينيبروديسينس إلى مصنع خلوي ميكروبي أساسي مرشح لإنتاج حمض السكسنيك وذلك نتيجة للتطبيق

الكامل لأدوات بيولوجيا الأنظمة: وهي تسلسل الجينوم، وإعادة هيكلة شبكة الأيض على مستوى الجينوم، والفلوكسومات، والبروتيومات، ومراجعة النموذج المتتالية. ويتعين ملاحظة أنه قد تم ذكر أساليب مشابهة لإيشيريشيا القولون و المانهيميا سكسينيبروديسينس؛ ومع ذلك، ومع وجود النقص النسبي للمعرفة الأساسية، وقصر وقت التطوير، وتنوع بيانات الأوميات التي تم جمعها ودمجها، فإنه تظل المانهيميا سكسينيبروديسينس هي المثال البارز لتطبيق بيولوجيا الأنظمة الصناعية بنجاح.

(٨,٢) الخاتمة والمنظور المستقبلي Conclusion and Future Perspectives

لقد وفر تطبيق الإطار الرياضي للأيض الميكروبي، الذي بدأ بجدية في أوائل الثلاثينيات، دعامة لمجموعات البيانات الكبيرة، والمتعلقة حالياً بالمجال الناشئ لبيولوجيا الأنظمة (الترانسكريبتومات، البروتيومات، والفلوكسومات، والميتابولومات) والواجب دمجه وتحليله وتوضيحه وفي النهاية إعادة صياغته إلى نماذج توقع يشار إليها بالشبكات المعاد هيكلتها للأيض على مستوى الجينوم. وقد منحت هذه الشبكات التي تبلغ حالياً ٣٠، إلى جانب تقنية الدنا المعدل، التي يتم تطبيقها مهندسوا الهندسة الأيضية القدرة على تحديد أهداف وراثية لإعادة توجيه تدفق الكربون من الأوساط المتجددة والمستدامة ومنخفضة التكلفة إلى الإنتاج الكيميائي للسلع ذات القيمة المضافة مع وجود احتمال عالٍ وواضح للنجاح. ويتم في الوقت الحالي هيكلة المصانع الخلوية الميكروبية لكي تلبي احتياجات تطوير عملية التقنية الحيوية الصناعية، المرتبطة مسبقاً بالعمليات الكلاسيكية للتطور الموجه، والفحص والاختيار، والعزل والتكاثر بشكلٍ أسرع وأكثر فاعلية من خلال استخدام صناديق أدوات بيولوجيا الأنظمة.

وبناءً على ذلك، فإننا هنا نعرف مصطلحاً جديداً، بيولوجيا الأنظمة الصناعية، الذي يشمل التطبيق المحدد للتقنيات على مستوى الجينوم، بصورةٍ معملية وحاسوبية؛ وذلك لتطوير عملية التقنية الحيوية الصناعية. ويتضح أثر بيولوجيا الأنظمة الصناعية على نطاقٍ كبير من المنتجات، التي يمكن تصنيفها كمنتجات ناضجة ومتطورة (مثل الإيثانول الحيوي)، ومنتجات حديثة وسريعة التطوير (مثل ١،٣-بروبان دايول)، ومنتجات قيد التطوير (مثل حمض السكسنيك).

وقد احتاجت شركة دوبونت أكثر من عشر سنوات من التطوير والعدد الكبير من المصادر وذلك للترويج التجاري النهائي والناجح لإنتاج التقنية الحيوية الصناعية من ١،٣-بروبان دايول. وكان التحدي في هذا المجال، ولاسيما لمهندسو الهندسة الأيضية وعلماء بيولوجيا الأنظمة الصناعية، هو تطوير عمليات مشابهة منخفضة التكاليف، وقابلة لزيادة المستوى، ومستدامة، ومتجددة وثابتة بجزءٍ صغير من الموارد. لذا فما هي أكبر المجالات لزيادة تطوير التقنية التي قد تساعد في تحقيق الهدف المذكور أعلاه؟

على الرغم من وجود عدد كبير من شبكات الأيض المعاد هيكلتها على مستوى الجينوم، فإن الأمر الشيق الذي يمكن ملاحظته يتمثل في التغطية الضعيفة نسبياً للأيض الميكروبي التي تقدمها تلك العمليات الخاصة بإعادة الهيكلة. ويوضح الفحص الدقيق للجدول رقم (٤, ٢) أن كافة شبكات الأيض المعاد هيكلتها كان لها متوسط تغطية جينوم تبلغ ٦, ١٤ ± ١, ٨٪ (ن=٢٩). وفي حالة عزل السكارروميسيس سيرفيسي، أكثر حقيقيات النواة توصيفاً، كمثال، فإن أحدث شبكة أيض معاد هيكلتها لها تغطية جينوم تقدر بـ ٦, ١٣٪، في حين أن ٤٦٩١ من إجمالي ٦٦٠٨ عدد الـ ORFs، ٩, ٧٠٪، لها وظيفة موثقة [١٦، ١٢٠]. ومن منظور أكثر شمولاً، فإن مشكلة سد فجوة الأيض تتفاقم بزيادة عدد أنشطة الأيض المعطلة، حيث إن ٣٠-٤٠٪ من النشاط الأيضي المعروف والمصنفة بواسطة لجنة الإنزيمات ليس لها تسلسلات وراثية مرتبطة في أي كائن حي [١١١، ١٦٥، ١٦٦]. وتبذل حالياً جهود هائلة لتوسيع إعادة هيكلة المسارات لتشمل مناطق الأيض المفهومة بشكلٍ ضعيف أو التي تم تجاهلها وظيفياً بدرجةٍ كبيرة [٨٩، ١١١].

وقد ركزت التقنية الحيوية الصناعية بشكلٍ كبير على إنتاج الكيماويات ذات القيمة المضافة والسلع الكيماوية؛ ومع ذلك، فإن قطاع النمو الأكبر المتوقع يكون في مجال الكيماويات التخصصية والدقيقة، حيث تقدم التقنية الحيوية الصناعية مسارات أكثر بساطة للكيمياء التخليقية المعقدة، أو إمكانية الكيماويات الجديدة التي قد تقدم تطبيقاً مماثلاً أو محسناً [٤، ٥]. وعادةً توجد الكيماويات التخصصية والدقيقة كنواتج أيض وسيطة في مناطق الأيض الثانوية والثلاثية، وعادة ما يتم تفسيرها بشكلٍ ضعيف ونادراً ما يتم إدراجها في إعادة هيكلة شبكات الجينوم. المثال الواضح لذلك في أيض الدهون في السكارروميسيس سيرفيسي، حيث شمل التحديث الأخير لإعادة هيكلة الأيض على مستوى الجينوم الحالي، iN795، ١١٨ تفاعل غير معروف للمواد الدهنية بالنسبة للـ iND750 (الجدول رقم ٤, ٢). ومن الـ ١١٨ تفاعل المشارك في أيض الدهون، فقد تم تخصيص ٢٨ لأسترة الإرجوستيرول وتحليل الدهون، التي لم يتم تقديمها مسبقاً (نوكاييف، ونيلسون، اتصالات شخصية، ٢٠٠٨م).

بالإضافة إلى التفسير المحدد والتوسع في نماذج الأيض إلى مسارات الأيض المجهولة، فإن طرق الحسابات المستخدمة للمحاكاة التوقعية وتحليل النماذج تتطور بشكلٍ سريع. فعلى سبيل المثال يمكن للتقييم المنهجي للمدى الواسع من الدوال الموضوعية، التي تشمل تعظيم عائد الكتلة الحيوية، وتعظيم عائد الـ ATP، والحد من التدفق العام داخل الخلايا، وتعظيم عائد الـ ATP لكل وحدة تدفق، وتعظيم عائد الكتلة الحيوية لكل وحدة تدفق، وتقليل معدل استهلاك الجلوكوز، وتقليل عدد خطوات التفاعل، وتقليل جهد الأكسدة والاختزال، وخفض تدفقات إنتاج الـ ATP، وتعظيم خفض تدفقات إنتاج الـ ATP، والحد من خطوات التفاعل، وذلك عند مقارنته

بالتدفقات المعملية التي تم تعيينها داخل الخلايا بواسطة نظائر الكربون أن يقدم منظوراً يمكن من خلاله تحديد أفضل دالة تعظيم تمثل شبكة الأيض [١٦٧].

وهناك مثالاً آخر قام بتطبيق إطار برمجة ثنائي المستوى لتحديد حذف الجينات الأمثل الذي يؤدي إلى زيادة إنتاج منتج مطلوب وذلك من خلال إدراج استنزاف كيميائي رياضي لتكوين الكتلة الحيوية، ومن ثم دمج الإنتاج وتكوين الكتلة الحيوية. وكشفت هذه الطريقة التي تسمى OptKnock، عن إستراتيجيات هندسة أيضية غير بديهية لإنتاج السكسينات واللاكتات والـ ١،٣-بروبان دايول، وقدمت بصفةٍ خاصة إستراتيجيات تساعد في تطوير نفسها من خلال التطور الموجه، حيث لا يرتبط اختيار النمو والتكيف بشكلٍ مباشر بالنمو [١٦٤]. وتدفع هذه الأمثلة، إلى جانب أمثلةٍ أخرى، من حدود إستراتيجيات هندسة الأيض غير البديهية ذات القيمة العالية والتي يمكن فك شفرتها من شبكات الجينوم المعاد هيكلتها [١٦٨-١٧٨].

وكما هو الحال في أي شبكة رياضية تقوم بدمج مجموعات ضخمة من البيانات الحيوية المتنوعة والتي يتم فحصها، وتحديثها، وإعادة تفسيرها، وتحليلها، ومناقشتها بشكلٍ مستمر، فإنه يتعين تحديد أهداف النمذجة الواضحة. ومن منظور التقنية الحيوية الصناعية، التي تركز على تحديد إستراتيجيات هندسة أيض غير بديهية عالية الإنتاج، وثابتة، وسهلة التطبيق، فإنه يجب التوسع في نمذجة الأيض الميكروبي من خلال تحليل توازن التدفقات الكيميائية الرياضية على أساس القيود، والتي تدمج البرهان المعملي، والتحديث والتوسيع اللاحق للنموذج. وربما تمكن الوفرة الناشئة للعوامل الحركية من إعادة الهيكلة الأيضية الديناميكية بشكلٍ بكامل في المستقبل، أما حالياً، فإنه يجب تحقيق الفوائد الكاملة للنمذجة الأيضية الكيميائية الرياضية في هيكلة الجيل التالي من المصانع الخلوية الميكروبية.

إن بيولوجيا الأنظمة الصناعية هي أسلوب جديد لتحدي كبير نسبياً: كيف نطور العمليات لإنتاج الكيماويات والمواد والطاقة، والتي تكون منخفضة التكلفة، ومتجددة، ومستدامة، وقابلة لزيادة المستوى، ومفضلة بيئياً؟

المراجع References

[١] Pass, F. (1981) Biotechnology, a new industrial revolution. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **4** (4), 476–477.

[٢] Ferrandiz-Garcia, F. (1982) Biotechnology. Genetic engineering. Chemico-pharmaceutical area. *Rev. Esp. Fisiol.*, **38** (Suppl.), 353–366.

[٣] Maury, J., Asadollahi, M.A., Moller, K., Clark, A., and Nielsen, J. (2005) Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **100,** 19–51.

[٤] Hirche, C. (2006) Trend Report No. 16: industrial biotechnology–white biotechnology: a promising tool for the chemical industry. ACHEMA 2006 28th International Exhibition-Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology, no. 16, pp. 1–7.

[٥] Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005) Biotechnology–a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.*, **23** (7–8), 471–499.

[٦] Nielsen, J. (1995) *PhysiologicalEngineering Aspects of Penicillium Chrysogenum*, Polyteknisk Forlag, Lyngby, p. 13.

[٧] US Energy Information Administration (2008) World crude oil price data. http://tonto.eia.doe.gov/ dnav/pet/ pet_pri_wco_k_w.htm (accessed May 2008).
[٨] US Energy Information Administration (2008) Natural gas price data. http://tonto.eia.doe.gov/dnav/ ng/ng_pri_ sum_dcu_nus_m.htm (accessed May 2008).
[٩] Hermann, B.G., Blok, K., and Patel, M.K. (2007) Producing bio-based bulk chemicals using industrial biotechnology saves energy and combats climate change. *Environ. Sci. Technol.,* **41** (22), 7915–7921.
[١٠] Otero, J.M., Panagiotou, G., and Olsson, L. (2007) Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.,* 2007; **108,** 1–40.
[١١] Renewable Fuels Association (2006) From Niche to Nation: Ethanol Industry Outlook 2006. http://www. ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/outlook_2006.pdf (accessed 5 May 2008).
[١٢] Dien, B.S., Cotta, M.A., and Jeffries, T.W. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **63** (3), 258–266.
[١٣] Russo, S., Berkovitz Siman-Tov, R., and Poli, G. (1995) Yeasts: from genetics to biotechnology. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.,* **14** (3–4), 133–157.
[١٤] Adrio, J.L. and Demain, A.L. (2006) Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol. Rev.,* **30** (2), 187–214.
[١٥] Smedsgaard, J. and Nielsen, J. (2005) Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J. Exp. Bot.,* **56** (410), 273–286.
[١٦] Fisk, D.G., Ball, C.A., Dolinski, K., Engel, S.R., Hong, E.L., Issel-Tarver, L., Schwartz, K., Sethuraman, A., Botstein, D., and Cherry, J.M. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: a working hypothesis. *Yeast,* **23** (12), 857–865.
[١٧] Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science,* **274** (5287), 546, 563–567.
[١٨] DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science,* **278** (5338), 680–686.
[١٩] Cho, R.J., Campbell, M.J., Winzeler, E.A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T.G., Gabrielian, A.E., Landsman, D., Lockhart, D.J., and Davis, R.W. (1998) A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell,* **2** (1), 65–73.
[٢٠] Forster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B.O., and Nielsen, J. (2003) Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res.,* **13** (2), 244–253.
[٢١] Famili, I., Forster, J., Nielsen, J., and Palsson, B.O. (2003) Saccharomyces cerevisiae phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **100** (23), 13134–13139.
[٢٢] Vemuri, G.N. and Aristidou, A.A. (2005) Metabolic engineering in the-omics era: elucidating and modulating regulatory networks. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.,* **69** (2), 197–216.
[٢٣] Patil, K.R., Akesson, M., and Nielsen, J. (2004) Use of genome-scale microbial models for metabolic engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.,* **15** (1), 64–69.
[٢٤] Stephanopoulos, G. (1999) Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab. Eng.,* **1** (1), 1–11.
[٢٥] Bro, C. and Nielsen, J. (2004) Impact of "ome" analyses on inverse metabolic engineering. *Metab. Eng.,* **6** (3), 204–211.
[٢٦] Lynd, L.R., Wyman, C.E., and Gerngross, T.U. (1999) Biocommodity Engineering. *Biotechnol. Prog.,* **15** (5), 777–793.
[٢٧] Parekh, S., Vinci, V.A., and Strobel, R.J. (2000) Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **54** (3), 287–301.
[٢٨] Demain, A.L. (2000) Microbial biotechnology. *Trends Biotechnol.,* **18** (1), 26–31.
[٢٩] Demain, A.L. and Adrio, J.L. (2008) Strain improvement for production of pharmaceuticals and other microbial metabolites by fermentation. *Prog. Drug Res.,* **65,** 251, 253–289.
[٣٠] Demain, A.L. and Adrio, J.L. (2008) Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.,* **38** (1), 41–55.
[٣١] Schmeisser, C., Steele, H., and Streit, W.R. (2007) Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **75** (5), 955–962.
[٣٢] Patnaik, R. (2008) Engineering complex phenotypes in industrial strains. *Biotechnol. Prog.,* **24** (1), 38–47.

[٣٣] Kluyver, A.J. (1980) Microbial metabolism and its bearing on the cancer problem. *Science*, **76,** 527–532.

[٣٤] Williams, H., Boyer, H.W., and Helsinki, D.R. (1973) Size and base composition of RNA in supercoiled plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70** (12), 3744–3748.

[٣٥] Pulley, H.C. and Greaves, J.D. (1932) An application of the autocatalytic growth curve to microbial metabolism. *J. Bacteriol.*, **24** (2), 145–168.

[٣٦] Robertson, T.B. (1923) *The Chemical Basis of Growth Senescence*, J.B. Lippincott Company, Washington Square Press, Philadelphia.

[٣٧] Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, 1st edn, John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag Co-Publication, New York.

[٣٨] Cohn, M., Monod, J., Pollock, M.R., Spiegelman, S., and Stanier, R.Y. (1953) Terminology of enzyme formation. *Nature*, **172** (4389), 1096.

[٣٩] Meyerhof, O. (1949) Further studies on the Harden-Young effect in alcoholic fermentation of yeast preparations. *J. Biol. Chem.*, **180** (2), 575–586.

[٤٠] Meyerhof, O. and Green, H. (1949) Synthetic action of phosphatase; equilibria of biological esters. *J. Biol. Chem.*, **178** (2), 655–667.

[٤١] Meyerhof, O. and Green, H. (1949) Transphosphorylation by alkaline phosphatase in the absence of nucleotides. *Science*, **110** (2863), 503.

[٤٢] Meyerhof, O. and Oesper, P. (1949) The enzymatic equilibria of phospho(enol)pyruvate. *J. Biol. Chem.*,**179** (3), 1371–1385.

[٤٣] Meyerhof, O. and Wilson, J.R. (1949) Studies on the enzymatic system of tumor glycolysis; glycolysis of free sugar in homogenates and extracts of transplanted rat sarcoma. *Arch. Biochem.*, **21** (1), 1–21.

[٤٤] Meyerhof, O. and Wilson, J.R. (1949) Studies on the enzymatic system of tumor glycolysis; comparative study of rat and mouse tumor homogenates. *Arch. Biochem.*, **21** (1), 22–34.

[٤٥] Meyerhof, O. and Wilson, J.R. (1949) Comparative study of the glycolysis and ATP-ase activity in tissue homogenates. *Arch. Biochem.*, **23** (2), 246–255.

[٤٦] Kobayashi, S. and Fukumi, H. (1954) Studies on the Embden-Meyerhof system and the Warburg-Lipman-Dickens pathway of the organisms of Pertussis-Parapertussis-Bronchisepticus group. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **7** (4), 377–384.

[٤٧] Mann, T. (1955) Prof. J. K. Parnas. *Nature*, **175** (4456), 532–533.

[٤٨] Warburg, O. and Christian, W. (1936) Pyridin, the hydrogen-transferring component of the fermentation enzymes (pyridine nucleotide). *Biochem. Z.*, **287,** 291.

[٤٩] Krebs, H.A. (1972) Otto Heinrich Warburg, 1883–1970. *Biogr. Mem. Fellows R. Soc.*, **18,** 629–699.

[٥٠] Cori, C.F., Schmidt, G., and Cori, G.T. (1939) The synthesis of a polysaccharide from glucose-1-phosphate in muscle extract. *Science*, **89** (2316), 464–465.

[٥١] Cori, G.T. (1954) Enzymes and glycogen structure in glycogenosis. *Z. Kinderheilkd.*, **10** (1–2), 38–42.

[٥٢] Cori, G.T. and Cori, C.F. (1952) Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J. Biol. Chem.*, **199** (2), 661–667.

[٥٣] Harden, A. (1913) The enzymes of washed zymin and dried yeast (lebedew). I. Carboxylase. *Biochem. J.*, **7** (2), 214–217.

[٥٤] Harden, A. and Norris, R.V. (1914) The enzymes of washed zymin and dried yeast (lebedeff). II. Reductase. *Biochem. J.*, **8** (1), 100–106.

[٥٥] Harden, A., Thompson, J., and Young, W.J. (1911) Apparatus for collecting and measuring the gases evolved during fermentation. *Biochem. J.*, **5** (5), 230–235.

[٥٦] Harden, A. and Young, W.J. (1913) The enzymatic formation of polysaccharides by yeast preparations. *Biochem. J.*, **7** (6), 630–636.

[٥٧] Harden, A. and Zilva, S.S. (1914) The enzymes of washed zymin and dried yeast (lebedeff). III. Peroxydase, catalase, invertase and maltase. *Biochem. J.*, **8** (3), 217–226.

[٥٨] Gottschalk, A. (1956) Prof. Carl Neuberg. *Nature*, **178** (4536), 722–723.

[٥٩] Krebs, H.A. (1935) Metabolism of amino-acids: deamination of amino-acids. *Biochem. J.*, **29** (7), 1620–1644.

[٦٠] Krebs, H.A. (1935) Metabolism of amino-acids: the synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem. J.*, **29** (8), 1951–1969.

[٦١] Krebs, H.A. (1938) Micro-determination of alpha-ketoglutaric acid. *Biochem. J.*, **32** (1), 108–112.

[٦٢] Krebs, H.A. (1937) The role of fumarate in the respiration of *Bacterium coli* commune. *Biochem. J.*, **31** (11), 2095–2124.

[٦٣] Krebs, H.A. (1940) The citric acid cycle and the Szent-Gyorgyi cycle in pigeon breast muscle. *Biochem. J.*, **34** (5), 775–779.

[٦٤] Krebs, H.A. and Cohen, P.P. (1939) Metabolism of alpha-ketoglutaric acid in animal tissues. *Biochem. J.*, **33** (11), 1895–1899.

[٦٥] Krebs, H.A. and Eggleston, L.V. (1940) The oxidation of pyruvate in pigeon breast muscle. *Biochem. J.*, **34** (3), 442–459.

[٦٦] Krebs, H.A. and Holzach, O. (1952) The conversion of citrate into cis-aconitate and isocitrate in the presence of aconitase. *Biochem. J.*, **52** (3), 527–528.

[٦٧] Krebs, H.A., Salvin, E., and Johnson, W.A. (1938) The formation of citric and alpha-ketoglutaric acids in the mammalian body. *Biochem. J.*, **32** (1), 113–117.

[٦٨] Krebs, H.A. (1964) *Nobel Lectures in Physiology Medicine, 1942–1962*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

[٦٩] Krebs, H.A., Gurin, S., and Eggleston, L.V. (1952) *Biochem. J.*, **51,** 614.

[٧٠] Krebs, H.A. (1948) The tricarboxylic acid cycle. *Harvey Lect.*, **44,** 165–199.

[٧١] Westerhoff, H.V. and Palsson, B.O. (2004) The evolution of molecular biology into systems biology. *Nat. Biotechnol.*, **22** (10), 1249–1252.

[٧٢] Oliver, S.G. (2006) From genomes to systems: the path with yeast. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **361** (1467), 477–482.

[٧٣] Hermann, B.G. and Patel, M. (2007) Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology: a techno-economic analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **136** (3), 361–388.

[٧٤] Nielsen, J. and Jewett, M.C. (2008) Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, **8** (1), 122–131.

[٧٥] Takors, R., Bathe, B., Rieping, M., Hans, S., Kelle, R., and Huthmacher, K. (2007) Systems biology for industrial strains and fermentation processes–example: amino acids. *J. Biotechnol.*, **129** (2), 181–190.

[٧٦] Demerec, M. (1948) Production of penicillin, US Patent 2,445,758.

[٧٧] Riggs, A.D. (1982) Method for microbial polypeptide expression, US Patent 4,366,246.

[٧٨] Laffend, L., Nagarajan, V., and Nakamura, C. (1997) Bioconversion of a fermentable carbon course to 1,3-propanediol by a single microorganism, US Patent 5,686,276.

[٧٩] Nakamura, C., Gatenby, A., Hsu, A.K., La Reau, R., Haynie, L., Diaz-Torres, M., Trimbur, D., Whited, G., Nagarajan, V., Payne, M., Picataggio, S., and Nair, R. (2000) Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant microorganisms, US Patent 6,013,494.

[٨٠] Moo-Young, M., Glick, B.R., Bu'Lock, J.D., and Cooney, C.L. (1984) Biotechnology has been associated with the pharmaceutical and brewing industries. *Biotechnol. Adv.*, **2** (2), I–II.

[٨١] Poppe, L. and Novak, L. (1992) *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[٨٢] Schmid, R.D. (2003) *Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engineering*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[٨٣] Bruggnik, A. (1996) Biocatalysis and process integration in the synthesis of semi-synthetic antibiotics: biotechnology for industrial production of fine chemicals. *Chimia*, **50,** 431–432.

[٨٤] Bruggink, A., Straathof, A.J., and van der Wielen, I.L. (2003) A "Fine" chemical industry for life science products: green solutions to chemical challenges. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **80,** 69–113.

[٨٥] Eriksson, K.E. (ed.) (1997) Biotechnology in the pulp and paper industry. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **57,** 339.

[٨٦] Kyrpides, N.C. (1999) Genomes OnLine Database (GOLD 1.0): a monitor of complete and ongoing genome projects world-wide. *Bioinformatics*, **15,** 773–774.

[٨٧] US Department of Energy (2008) The fiscal year 2008 budget. http://www.doe.gov/about/budget.htm (accessed May 2008).

[٨٨] National Institutes of Health (2008) The fiscal year 2008 budget. http://officeofbudget.od.nih.gov/ui/HomePage.htm (accessed May 2008).

[٨٩] Viswanathan, G., Seto, J., Patil, S., Nudelman, G., and Sealfon, S. (2008) Getting started in biological pathway construction and analysis. *PLoS Comput. Biol.*, **4** (2).
[٩٠] Bruggeman, F.J. and Westerhoff, H.V. (2007) The nature of systems biology. *Trends Microbiol.*, **15** (1), 45–50.
[٩١] Bailey, J.E. (1991) Toward a science of metabolic engineering. *Science*, **252** (5013), 1668–1675.
[٩٢] Stephanopoulos, G. and Vallino, J.J. (1991) Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, **252** (5013), 1675–1681.
[٩٣] Nielsen, J. (2001) Metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55** (3), 263–283.
[٩٤] Kern, A., Tilley, E., Hunter, I.S., Legisa, M., and Glieder, A. (2007) Engineering primary metabolic pathways of industrial micro-organisms. *J. Biotechnol.*, **129** (1), 6–29.
[٩٥] Tyo, K.E., Alper, H.S., and Stephanopoulos, G.N. (2007) Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells. *Trends Biotechnol.*, **25** (3), 132–137.
[٩٦] Edwards, J.S., Covert, M., and Palsson, B. (2002) Metabolic modeling of microbes: the flux-balance approach. *Environ. Microbiol.*, **4** (3), 133–140.
[٩٧] Edwards, J.S., Ramakrishna, R., and Palsson, B.O. (2002) Characterizing the metabolic phenotype: a phenotype phase plane analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **77** (1), 27–36.
[٩٨] Forster, J., Famili, I., Palsson, B.O., and Nielsen, J. (2003) Large-scale evaluation of in silico gene deletions in *Saccharomyces cerevisiae. OMICS*, **7** (2), 193–202.
[٩٩] Barwell, C.J. and Hess, B. (1972) Application of kinetics of yeast pyruvate kinase in vitro to calculation of glycolytic flux in the anaerobic yeast cell. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **353** (7), 1178–1184.
[١٠٠] Savageau, M.A. (1969) Biochemical systems analysis. I. Some mathematical properties of the rate law for the component enzymatic reactions. *J. Theor. Biol.*, **25** (3), 365–369.
[١٠١] Savageau, M.A. (1969) Biochemical systems analysis. II. The steady-state solutions for an n-pool system using a power-law approximation. *J. Theor. Biol.*, **25** (3), 370–379.
[١٠٢] Savageau, M.A. (1970) Biochemical systems analysis. 3. Dynamic solutions using a power-law approximation. *J. Theor. Biol.*, **26** (2), 215–226.
[١٠٣] Kacser, H. and Burns, J.A. (1973) The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **27,** 65–104.
[١٠٤] Heinrich, R. and Rapoport, T.A. (1973) Linear theory of enzymatic chains; its application for the analysis of the crossover theorem and of the glycolysis of human erythrocytes. *Acta Biol. Med. Ger.*, **31** (4), 479–494.
[١٠٥] Heinrich, R. and Rapoport, T.A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.*, **42** (1), 89–95.
[١٠٦] Heinrich, R. and Rapoport, T.A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. Critique of the crossover theorem and a general procedure to identify interaction sites with an effector. *Eur. J. Biochem.*, **42** (1), 97–105.
[١٠٧] Rapoport, T.A., Heinrich, R., Jacobasch, G., and Rapoport, S. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **42** (1), 107–120.
[١٠٨] Covert, M.W., Schilling, C.H., Famili, I., Edwards, J.S., Goryanin, I.I., Selkov, E., and Palsson, B.O. (2001) Metabolic modeling of microbial strains in silico. *Trends Biochem. Sci.*, **26** (3), 179–186.
[١٠٩] Price, N.D., Papin, J.A., Schilling, C.H., and Palsson, B.O. (2003) Genome-scale microbial in silico models: the constraints-based approach. *Trends Biotechnol.*, **21** (4), 162–169.
[١١٠] Borodina, I. and Nielsen, J. (2005) From genomes to in silico cells via metabolic networks. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16** (3), 350–355.
[١١١] Breitling, R., Vitkup, D., and Barrett, M.P. (2008) New surveyor tools for charting microbial metabolic maps. *Nat. Rev. Microbiol.*, **6** (2), 156–161.
[١١٢] Edwards, J.S., Ibarra, R.U., and Palsson, B.O. (2001) In silico predictions of Escherichia coli metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat. Biotechnol.*, **19** (2), 125–130.
[١١٣] Roscoe, H. and Harden, A. (1895) *ANew View of the Origin of Dalton's Atomic Theory*, Macmillan and Co., London.
[١١٤] Dodds, D.R. and Gross, R.A. (2007) Chemistry. Chemicals from biomass. *Science*, **318** (5854), 1250–1251.

[١١٥] Hatti-Kaul, R., Tornvall, U., Gustafsson, L., and Borjesson, P. (2007) Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals–a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol.*, **25** (3), 119–124.

[١١٦] Renewable Fuels Association (2008) Changing the climate: ethanol industry outlook. http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/RFA_Outlook_2008.pdf (accessed 5 May 2008).

[١١٧] Duarte, N.C., Palsson, B.O., and Fu, P. (2004) Integrated analysis of metabolic phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae. BMC Genomics*, **5** (1), 63.

[١١٨] Liolios, K., Mavromatis, K., Tavernarakis, N., and Kyrpides, N.C. (2008) The Genomes On Line Database (GOLD) in 2007: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Res.*, **36** (Database issue), D475–D479.

[١١٩] Liolios, K., Tavernarakis, N., Hugenholtz, P., and Kyrpides, N.C. (2006) The Genomes On Line Database (GOLD) v.2: a monitor of genome projects worldwide. *Nucleic Acids Res.*, **34** (Database issue), D332–D334.

[١٢٠] Hong, E.L., Balakrishnan, R., Dong, Q., Christie, K.R., Park, J., Binkley, G., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hitz, B.C., Krieger, C.J., Livstone, M.S., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Oughtred, R., Skrzypek, M.S., Weng, S., Wong, E.D., Zhu, K.K., Dolinski, K., Botstein, D., Cherry, J.M. (2008) Gene ontology annotations at SGD: new data sources and annotation methods. *Nucleic Acids Res.*, **36** (Database issue), D577–D581.

[١٢١] Nissen, T.L., Kielland-Brandt, M.C., Nielsen, J., and Villadsen, J. (2000) Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metab. Eng.*, **2** (1), 69–77.

[١٢٢] Bro, C., Regenberg, B., Forster, J., and Nielsen, J. (2006) In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metab. Eng.*, **8** (2), 102–111.

[١٢٣] Phelps, T.J., Palumbo, A.V., and Beliaev, A.S. (2002) Metabolomics and microarrays for improved understanding of phenotypic characteristics controlled by both genomics and environmental constraints. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13** (1), 20–24.

[١٢٤] Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., and Hood, L. (2001) Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, **292** (5518), 929–934.

[١٢٥] Erasmus, D.J., van der Merwe, E.G., and van Vuuren, H.J. (2003) Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res.*, **3**(4), 375–399.

[١٢٦] Cakir, T., Kirdar, B., and Ulgen, K.O. (2004) Metabolic pathway analysis of yeast strengthens the bridge between transcriptomics and metabolic networks. *Biotechnol. Bioeng.*, **86** (3), 251–260.

[١٢٧] Cakir, T., Patil, K.R., Onsan, Z.I., Ulgen, K.O., Kirdar, B., and Nielsen, J. (2006) Integration of metabolome data with metabolic networks reveals reporter reactions. *Mol. Syst. Biol.*, **2,** 50.

[١٢٨] Olsson, L., Jørgensen, H., Krogh, K., and Roca, C. (2004) Bioethanol production from lignocellulosic material, in *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, 2nd edn (ed. Dumitriu, S.), Marcel Dekker, New York, pp. 957–993.

[١٢٩] Grotkjaer, T., Christakopoulos, P., Nielsen, J., and Olsson, L. (2005) Comparative metabolic network analysis of two xylose fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab. Eng.*, **7** (5–6), 437–444.

[١٣٠] Roca, C., Nielsen, J., and Olsson, L. (2003) Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (8), 4732–4736.

[١٣١] Sonderegger, M., Schumperli, M., and Sauer, U. (2004) Metabolic engineering of a phosphoketolase pathway for pentose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(5), 2892–2897.

[١٣٢] Herrgard, M.J., Fong, S.S., and Palsson, B.O. (2006) Identification of genome-scale metabolic network models using experimentally measured flux profi les. *PLoS Comput. Biol.*, **2** (7).

[١٣٣] Antoni, D., Zverlov, V.V., and Schwarz, W.H. (2007) Biofuels from microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77** (1), 23–35.

[١٣٤] E. I. du Pont de Nemours and Company (DuPont) (2008) Sorona® renewably sourced polymer. http://www2.dupont.com/Sorona/en_US/(accessed 5 May 2008).

[١٣٥] E. I. du Pont de Nemours and Company (DuPont). (2007) Annual Review. http://library.corporate-ir.net/library/73/733/73320/items/283770/DD_2007_AR_v2.pdf (accessed 5 May 2008).

[١٣٦] Bhatia, S.K. and Kurian, J.V. (2008) Biological characterization of Sorona polymer from corn-derived 1,3-propanediol. *Biotechnol. Lett.*, **30** (4), 619–623.
[١٣٧] Nakamura, C.E. and Whited, G.M. 2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**(5), 454–459.
[١٣٨] Freund, A. (1881) Ueber die bildung und darstellung von trimethylene-alkohol aus glycerin. *Monatsh. Chem.*, **2,** 636–641.
[١٣٩] Braak, H.R. (1928) Onderzoekingen over Vergisting van Glycerine. Delft.
[١٤٠] Mickelson, M.N. and Werkman, C.H. (1940) The dissimilation of glycerol by coli-aerogenes intermediates. *J. Bacteriol.*, **39** (6), 709–715.
[١٤١] Cameron, D.C., Altaras, N.E., Hoffman, M.L., and Shaw, A.J. (1998) Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol. Prog.*, **14** (1), 116–125.
[١٤٢] Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.P., and Deckwer, W.D. (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52** (3), 289–297.
[١٤٣] Zeng, A.P. and Biebl, H. (2002) Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **74,** 239–259.
[١٤٤] Antoniewicz, M.R., Kraynie, D.F., Laffend, L.A., Gonzalez-Lergier, J., Kelleher, J.K., and Stephanopoulos, G. (2007) Metabolic flux analysis in a nonstationary system: fed-batch fermentation of a high yielding strain of *E. coli* producing 1,3-propanediol. *Metab. Eng.*, **9** (3), 277–292.
[١٤٥] Antoniewicz, M.R., Kelleher, J.K., and Stephanopoulos, G. (2007) Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions. *Metab. Eng.*, **9** (1), 68–86.
[١٤٦] Mu, Y., Teng, H., Zhang, D.J., Wang, W., and Xiu, Z.L. (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.*, **28** (21), 1755–1759.
[١٤٧] Cheng, K.K., Zhang, J.A., Liu, D.H., Sun, Y., Yang, M.D., and Xu, J.M. (2006) Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* from glycerol broth. *Biotechnol. Lett.*, **28** (22), 1817–1821.
[١٤٨] Zhang, Q., Teng, H., Sun, Y., Xiu, Z., and Zeng, A. (2008) Metabolic flux and robustness analysis of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **31** (2), 127–135.
[١٤٩] Chi, N., Liu, C., Liu, Y., Zhang, Q., and Zheng, X. (2003) Cloning and expressing of 1,3-propanediol oxidoreductase-encoding gene. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **43** (6), 717–721.
[١٥٠] Liu, H.J., Zhang, D.J., Xu, Y.H., Mu, Y., Sun, Y.Q., and Xiu, Z.L. (2007) Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumonia* under micro-aerobic conditions up to apilot scale. *Biotechnol. Lett.*, **29** (8), 1281–1285.
[١٥١] Short, P.L. (2006) Global Top 50. *Chem. Eng. News*, **84** (30), 13–16.
[١٥٢] E. I. du Pont de Nemours and Company (2005) *Energy Impact and Implications for Pricing*, DuPont's Economist's Office, Press Release. http://www2.dupont.com/Media_Center/en_US/assets/downloads/pdf/ Newsletter_Economist_Offi ce.pdf (accessed 5 May 2008).
[١٥٣] US Department of Energy (2004) Top value added chemicals from biomass: volume I. http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf (accessed 5 May 2008).
[١٥٤] Zeikus, J.G., Jain, M.K., and Elankovan, P., (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51,** 545–552.
[١٥٥] Song, H. and Lee, S.J. (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, **39** (3), 352–361.
[١٥٦] McKinlay, J.B., Vieille, C., and Zeikus, J.G. (2007) Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76** (4), 727–740.
[١٥٧] Jantama, K., Haupt, M.J., Svoronos, S.A., Zhang, X., Moore, J.C., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. (2008) Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol. Bioeng.*, **99** (5), 1140–1153.
[١٥٨] Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., and Chang, H.N. (2002) Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58** (5), 663–668.
[١٥٩] Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., and Chang, H.N. (2003) Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **26** (1), 63–67.

[١٦٠] Hong, S.H., Kim, J.S., Lee, S.Y., In, Y.H., Choi, S.S., Rih, J.K., Kim, C.H., Jeong, H., Hur, C.G., and Kim, J.J. (2004) The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens. Nat. Biotechnol.,* **22** (10), 1275–1281.

[١٦١] Lee, S.J., Song, H., and Lee, S.Y. (2006) Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.,* **72** (3), 1939–1948.

[١٦٢] Lee, J.W., Lee, S.Y., Song, H., and Yoo, J.-S. (2006) The proteome of *Mannheimia succiniciproducens*, a capnophilic rumen bacterium. *Proteomics,* **6** (12), 3550–3566.

[١٦٣] Kim, T.Y., Kim, H.U., Park, J.M., Song, H., Kim, J.S., and Lee, S.Y. (2007) Genome-scale analysis of *Mannheimia succiniciproducens* metabolism. *Biotechnol. Bioeng.,* **97** (4), 657–671.

[١٦٤] Burgard, A.P., Pharkya, P., and Maranas, C.D. (2003) Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnol. Bioeng.,* **84** (6), 647–657.

[١٦٥] Green, M.L. and Karp, P.D. (2005) Genome annotation errors in pathway databases due to semantic ambiguity in partial EC numbers. *Nucleic Acids Res.,* **33** (13), 4035–4039.

[١٦٦] Lespinet, O. and Labedan, B. (2006) Orphan enzymes could be an unexplored reservoir of new drug targets. *Drug Discov. Today,* **11** (7–8), 300–305.

[١٦٧] Schuetz, R., Kuepfer, L., and Sauer, U. (2007) Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fl uxes in *Escherichia coli. Mol. Syst. Biol.,* **3,** 119.

[١٦٨] Joyce, A.R. and Palsson, B.O. (2008) Predicting gene essentiality using genome-scale in silico models. *Methods Mol. Biol,* **416,** 433–457.

[١٦٩] Joyce, A.R. and Palsson, B.O. (2007) Toward whole cell modeling and simulation: comprehensive functional genomics through the constraint-based approach. *Prog. Drug Res.,* **64,** 265, 267–265, 309.

[١٧٠] Joyce, A.R., Reed, J.L., White, A., Edwards, R., Osterman, A., Baba, T., Mori, H., Lesely, S.A., Palsson, B.O., and Agarwalla, S. (2006) Experimental and computational assessment of conditionally essential genes in *Escherichia coli. J. Bacteriol.,* **188** (23), 8259–8271.

[١٧١] Joyce, A.R. and Palsson, B.O. (2006) The model organism as a system: integrating "omics" data sets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.,* **7** (3), 198–210.

[١٧٢] Rocha, I., Forster, J., and Nielsen, J. (2008) Design and application of genome-scale reconstructed metabolic models. *Methods Mol. Biol.,* **416,** 409–431.

[١٧٣] Kim, H.U., Kim, T.Y., and Lee, S.Y. (2008) Metabolic flux analysis and metabolic engineering of microorganisms. *Mol. Biosyst.,* **4** (2), 113–120.

[١٧٤] Kim, T.Y., Sohn, S.B., Kim, H.U., and Lee, S.Y. (2008) Strategies for systems-level metabolic engineering. *Biotechnol. J.,* **3,** 612–623.

[١٧٥] Notebaart, R.A., Teusink, B., Siezen, R.J., and Papp, B. (2008) Co-regulation of metabolic genes is better explained by flux coupling than by network distance. *PLoS Comput. Biol.,* **4** (1).

[١٧٦] Notebaart, R.A., van Enckevort, F.H., Francke, C., Siezen, R.J., and Teusink, B. (2006) Accelerating the reconstruction of genome-scale metabolic networks. *BMC Bioinformatics,* **7,** 296.

[١٧٧] Zhao, J., Ding, G.H., Tao, L., Yu, H., Yu, Z.H., Luo, J.H., Cao, Z.W., and Li, Y.X. (2007) Modular co-evolution of metabolic networks. *BMC Bioinformatics*, **8,** 311.

[١٧٨] Satish Kumar, V., Dasika, M.S., and Maranas, C.D. (2007) Optimization based automated curation of metabolic reconstructions. *BMC Bioinformatics,* **8,** 212.

[١٧٩] Gong, C.-S. (1985) Direct fermentation of D-xylose to ethanol by a xylose-fermenting yeast mutant, US Patent4,511,656.

[١٨٠] Blattner, F.R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277** (5331), 1453–1462.

[١٨١] Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., *et al.* (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269** (5223), 496–512.

[١٨٢] Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley,

J.M., Cotton, M.D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M., Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori. Nature* **388**(6642), 539–547.

[١٨٣] Gardner, M.J., Shallom, S.J., Carlton, J.M., Salzberg, S.L., Nene, V., Shoaibi, A., Ciecko, A., Lynn, J., Rizzo, M., Weaver, B., Jarrahi, B., Brenner, M., Parvizi, B., Tallon, L., Moazzez, A., Granger, D., Fujii, C., Hansen, C., Pederson, J., Feldblyum, T., Peterson, J., Suh, B., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., White, O., Cummings, L.M., Smith, H.O., Adams, M.D., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Fraser, C.M. (2002) Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature* **419** (6906), 531–534.

[١٨٤] Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S., Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii. Science* **273** (5278), 1058–1073.

[١٨٥] Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O ' Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature.* **417** (6885), 141–147.

[١٨٦] Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G., Debets, A.J., Dekker, P., van Dijck, P.W., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A.J., d ' Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G.S., de Groot, P.W., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J.P., van den Hondel, C.A., van der Heijden, R.T., van der Kaaij, R.M., Klis, F.M., Kools, H.J., Kubicek, C.P., van Kuyk, P.A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M.J., Meulenberg, R., Menke, H., Mortimer, M.A., Nielsen, J., Oliver, S.G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N.N., Ram, A.F., Rinas, U., Roubos, J.A., Sagt, C.M., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., van de Vondervoort, P.J., Wedler, H., W ö sten, H.A., Zeng, A.P., van Ooyen, A.J., Visser, J., Stam, H. (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS *513.88. Nat. Biotechnol.* **25** (2), 221–231.

[١٨٧] Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Baştürkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D' Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Pe ñ alva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A., Birren, B.W. (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae. Nature* **438** (7071), 1105–1115.

[١٨٨] Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae. Nature* **438** (7071), 1157–1161.

[١٨٩] Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11** (5), 731–753.

[١٩٠] Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., Stiekema, W., Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (4), 1990–1995.

[١٩١] Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A. *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis. Nature* **390** (6657), 249–256.

[١٩٢] Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K. (2001) Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus. Lancet* **357** (9264), 1225–1240.

[١٩٣] Ikeda, M., Nakagawa, S. (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnology cal processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62** (2–3), 99–109.

[١٩٤] Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E. 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393** (6685), 537–544.

[١٩٥] Maeder, D.L., Anderson, I., Brettin, T.S., Bruce, D.C., Gilna, P., Han, C.S., Lapidus, A., Metcalf, W.W., Saunders, E., Tapia, R., Sowers, K.R. (2006) The *Methanosarcina barkeri* genome: comparative analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* reveals extensive rearrangement within methanosarcinal genomes. *J. Bacteriol.* **188** (22), 7922–7931.

[١٩٦] González, V., Santamaría, R.I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S.C., Ramírez, M.A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., Dávila, G. (2006) The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (10), 3834–3839.

[١٩٧] Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfi eld, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R.,

Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kaspryzk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen Y.J. ; International Human Genome Sequencing Consortium. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**(6822), 860–921.

[١٩٨] Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S., Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K.D., Deri, J., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Dickens, N.J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D.M., Eddy, S.R., Elnitski, L., Emes, R.D., Eswara, P., Eyras, E., Felsenfeld, A., Fewell, G.A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W.N., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Furey, T.S., Gage, D., Gibbs, R.A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T.A., Green, E.D., Gregory, S., Guig ó, R., Guyer, M., Hardison, R.C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L.W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D.B., Johnson, L.S., Jones, M., Jones, T.A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E.K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W.J., Kirby, A., Kolbe, D.L., Korf, I., Kucherlapati, R.S., Kulbokas, E.J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J.P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D.R., Mardis, E.R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J.H., McCarthy, M., McCombie, W.R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J.D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J.P., Miller, W., Miner, T.L., Mongin, E., Montgomery, K.T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J.C., Muzny, D.M., Nash, W.E., Nelson, J.O., Nhan, M.N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M.J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K.H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C.S., Poliakov, A., Ponce, T.C., Ponting, C.P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B.A., Roskin, K.M., Rubin, E.M., Rust, A.G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M.S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J.B., Slater, G., Smit, A., Smith, D.R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J.P., Von Niederhausern, A.C., Wade, C.M., Wall, M., Weber, R.J., Weiss, R.B., Wendl, M.C., West, A.P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R.K., Winter, E., Worley, K.C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S.P., Zdobnov, E.M., Zody, M.C., Lander, E.S. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420** (6915), 520–562.

[١٩٩] Edwards, J.S., Palsson, B.O. (2000) The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: its defi nition, characteristics, and capabilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (10), 5528–5533.

[٢٠٠] Reed, J.L., Vo, T.D., Schilling, C.H., Palsson, B.O. (2003) An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). *Genome Biol.* **4** (9), R54.

[٢٠١] Feist, A.M., Henry, C.S., Reed, J.L., Krummenacker, M., Joyce, A.R., Karp, P.D., Broadbelt, L.J., Hatzimanikatis, V., Palsson, B.Ø. (2007) A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* **3,** 121.

[٢٠٢] Förster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B. Ø., Nielsen, J. (2003) Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res.* **13** (2), 244–253.

[٢٠٣] Duarte, N.C., Herrgård, M.J., Palsson, B. Ø. (2004) Reconstruction and validation of Saccharomyces cerevisiae iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. *Genome Res.* **14** (7), 1298–1309.

[٢٠٤] Blank, L.M., Kuepfer, L., Sauer U. (2005) Large-scale 13C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome Biol.* **6** (6), R49.

[٢٠٥] Nookaew, I., Jewett, M.C., Meechai, A., Thammarongtham, C., Laoteng, K., Cheevadhanarak, S., Nielsen, J., Bhumiratana, S. (2008) The genome-scale metabolic model iIN800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism. *BMC Syst. Biol.* **2,** 71.

[٢٠٦] Schilling, C.H., Palsson, B.O. (2000) Assessment of the metabolic capabilities of *Haemophilus influenzae* Rd through a genome-scale pathway analysis. *J Theor. Biol.* **203** (3), 249–283.

[٢٠٧] Schilling, C.H., Covert, M.W., Famili, I., Church, G.M., Edwards, J.S., Palsson, B.O. (2002) Genome-scale metabolic model of *Helicobacter pylori* 26695. *J. Bacteriol.* **184** (16), 4582–4593.

[٢٠٨] Thiele, I., Vo, T.D., Price, N.D., Palsson, B. Ø. (2005) Expanded metabolic reconstruction of *Helicobacter pylori* (iIT341 GSM/GPR): an in silico genome-scale characterization of single-and double-deletion mutants. *J. Bacteriol.* **187** (16), 5818–5830.

[٢٠٩] Yeh, I., Hanekamp, T., Tsoka, S., Karp, P.D., Altman, R.B. (2004) Computational analysis of *Plasmodium falciparum* metabolism: organizing genomic information to facilitate drug discovery. *Genome Res.* **14** (5), 917–24.

[٢١٠] Tsoka, S., Simon, D., Ouzounis, C.A. (2004) Automated metabolic reconstruction for *Methanococcus jannaschii. Archaea* **1** (4), 223–229.

[٢١١] Borodina, I., Krabben, P., Nielsen, J. (2005) Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A **3** (2) metabolism. *Genome Res.* **15** (6), 820–829.

[٢١٢] David, H., Akesson, M., Nielsen, J. (2003) Reconstruction of the central carbon metabolism of *Aspergillus niger. Eur. J. Biochem.* **270** (21), 4243–4253.

[٢١٣] Sun, J., Lu, X., Rinas, U., Zeng, A.P. (2007) Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol.* **8** (9), R182.

[٢١٤] Andersen, M.R., Nielsen, M.L., Nielsen, J. (2008) Metabolic model integration of the bibliome, *genome,* metabolome and reactome of *Aspergillus niger. Mol. Syst. Biol.* **4,** 178.

[٢١٥] David, H., Hofmann, G., Oliveira, A.P., Jarmer, H., Nielsen, J. (2006) Metabolic network driven analysis of genome-wide transcription data from *Aspergillus nidulans. Genome Biol.* **7** (11), R108.

[٢١٦] Vongsangnak, W., Olsen, P., Hansen, K., Krogsgaard, S., Nielsen, J. (2008) Improved annotation through genome-scale metabolic modeling of *Aspergillus oryzae. BMC Genomics* **9,** 245.

[٢١٧] Oliveira, A.P., Nielsen, J., Förster, J. (2005) Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiol.* **5,** 39.

[٢١٨] Teusink, B., van Enckevort, F.H., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E.J., Siezen, R.J. (2005) In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (11), 7253–7262.

[٢١٩] Oh, Y.K., Palsson, B.O., Park, S.M., Schilling, C.H., Mahadevan, R. (2007) Genome-scale reconstruction of metabolic network in Bacillus subtilis based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data. *J. Biol. Chem.* **282** (39), 28791–28799.

[٢٢٠] Goelzer, A., Bekkal Brikci, F., Martin-Verstraete, I., Noirot, P., Bessières, P., Aymerich, S., Fromion, V. (2008) Reconstruction and analysis of the genetic and metabolic regulatory networks of the central metabolism of *Bacillus subtilis. BMC Syst. Biol.* **2,** 20.

[٢٢١] Becker, S.A., Palsson, B. Ø. (2005) Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Staphylococcus aureus* N315: an initial draft to the two-dimensional annotation. *BMC Microbiol.* **5,** 8.

[٢٢٢] Kjeldsen, K.R., Nielsen, J. (2009) In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnol. Bioeng.* **102** (2), 583–597.

[٢٢٣] Jamshidi, N., Palsson, B. Ø. (2007) Investigating the metabolic capabilities of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv using the in silico strain iNJ661 and proposing alternative drug targets. *BMC Syst. Biol.* **1,** 26.

[٢٢٤] Beste, D.J., Hooper, T., Stewart, G., Bonde, B., Avignone-Rossa, C., Bushell, M.E., Wheeler, P., Klamt, S., Kierzek, A.M., McFadden J. (2007) GSMN-TB: a web-based genome-scale network model of *Mycobacterium tuberculosis* metabolism. *Genome Biol.* **8** (5), R89.

[٢٢٥] Feist, A.M., Scholten, J.C., Palsson, B. Ø., Brockman, F.J., Ideker, T. (2006) Modeling methanogenesis with a genome-scale metabolic reconstruction of *Methanosarcina barkeri. Mol. Syst. Biol*. **2,** 2006.0004.

[٢٢٦] Resendis-Antonio, O., Reed, J.L., Encarnaci ó n, S., Collado-Vides, J., Palsson, B. Ø. (2007) Metabolic reconstruction and modeling of nitrogen fixation in *Rhizobium etli. PLoS Comput. Biol.* **3** (10), 1887–1895.

[٢٢٧] Duarte, N.C., Becker, S.A., Jamshidi, N., Thiele, I., Mo, M.L., Vo, T.D., Srivas, R., Palsson, B. Ø. (2007) Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (6), 1777–1782.

[٢٢٨] Vo, T.D., Greenberg, H.J., Palsson, B.O. (2004) Reconstruction and functional characterization of the human mitochondrial metabolic network based on proteomic and biochemical data. *J. Biol. Chem.* **279** (38), 39532–39540.

[٢٢٩] Sheikh, K., Förster, J., Nielsen, L.K. (2005) Modeling hybridoma cell metabolism using a generic genome-scale metabolic model of *Mus musculus. Biotechnol. Prog.* **21** (1), 112–121.

[٢٣٠] Patil, K.R. and Nielsen, J. (2005) Uncovering transcriptional regulation of metabolism by using metabolic network topology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **102,** 2685–2689.

obeikandl.com

الفصل الثالث

تقنية التخمير
FERMENTATION TECHNOLOGY

يوسف شيستي
Yusuf Chisti

(٣,١) المقدمة Introduction

تستخدم عمليات التخمير الكائنات الحية الدقيقة لتحويل وسط البيئة إلى بعض المنتجات. وينظر إلى التحويلات أو التحويلات الحيوية التي تتم في المختبر من خلال عمل خلايا الحيوانات والنباتات على أنها أيضاً عمليات تخمير. ونظراً للتنوع الهائل في أوساط البيئة الممكنة، والكائنات الدقيقة، والمنتجات، فإنه يمكن أن تكون عمليات التخمير متنوعة للغاية. وتشمل الأمثلة على الكثير من الأنواع المختلفة من المنتجات التي تنتج تخميرياً ما يلي: الخبز والجبن والنبيذ والبيرة، والقهوة، والإنزيمات الطبية والصناعية، والأحماض الأمينية، والمضادات الحيوية، وصلصة الصويا، والسماد، والبوليمرات الحيوية، والبلاستيكات الحيوية، والزيوت الميكروبية، ومكسبات النكهة، والملونات، والمواد الكيميائية المتخصصة، واللقاحات، والبروتينات العلاجية، وغيرها من الكثير من المنتجات.

وتبدأ عملية التخمير بحقن البيئة بالكائن الدقيق المطلوب. ويتم وضع البيئة المحقونة تحت الظروف البيئية التي تساعد على تحويلها إلى المنتج المطلوب. ويمكن استخدام المنتج الخام مباشرةً، أو قد يتم معالجته بشكلٍ أكبر لعزل مركبات جزيئية منه.

(٣,٢) أنواع التخمير Types of Fermentations

يمكن تصنيف معظم عمليات التخمير المفيدة تجارياً على أنها إما زراعات الحالة الصلبة وإما الزراعات المغمورة. في زراعات الحالة الصلبة، تنمو الكائنات الدقيقة على سطح صلب جاف بالقليل من أو بدون مياه "حرة"، وذلك على الرغم من أن الماء الشعري قد يكون موجوداً [١]. ويمكن مشاهدة أمثلة لتخمير البيئة الصلبة

obeikandl.com

في صنع الجبن، والخبز والقهوة والسماد [١]. ويمكن أن يستخدم التخمير المغمور [٢، ٣] أوساط ذائبة (مثل محلول السكر) أو وسط صلب معلق في كمية كبيرة من الماء لتشكيل معلق كثيف. وتستخدم التخميرات المغمورة في إنتاج البنسيلين، والإنسولين المعدل، والبيرة، والكثير من المنتجات الأخرى.

ويمكن تقسيم كلٍ من التخميرات الصلبة أو المغمورة إلى عمليات هوائية تتطلب الأوكسجين وعمليات لاهوائية والتي يجب أن تتم في غياب الأوكسجين. وتشمل أمثلة التخميرات الهوائية المغمورة إنتاج المضاد الحيوي البنسيلين باستخدام فطر البنسيليوم كريزوجينوم. ويتم إنتاج منتجات اللحوم المخمرة مثل الببروني والسلامي بالتخميرات اللاهوائية الصلبة. ويحدث تخمير لاهوائي مغمور في صناعة الزبادي.

وقد تتطلب التخميرات نوع واحد فقط من الميكروبات لإحداث التغيير الكيميائي الحيوي المطلوب، أي أنها تكون أحادية الكائن. وفي هذه التخميرات يجب تعقيم البيئة لقتل الكائنات الحية الدقيقة غير المرغوب فيها قبل التلقيح بالكائن المرغوب. وتستخدم التخميرات أحادية الكائن أو الزراعات الأحادية لإنتاج الكثير من المنتجات الدوائية مثل الإنسولين. وتتطلب تخميرات كثير من المواد الغذائية وعمليات معالجة المخلفات الحيوية مشاركة عدة أنواع من الميكروبات، أو الزراعات المختلطة، التي تعمل في وقتٍ واحد و/ أو بالتتابع.

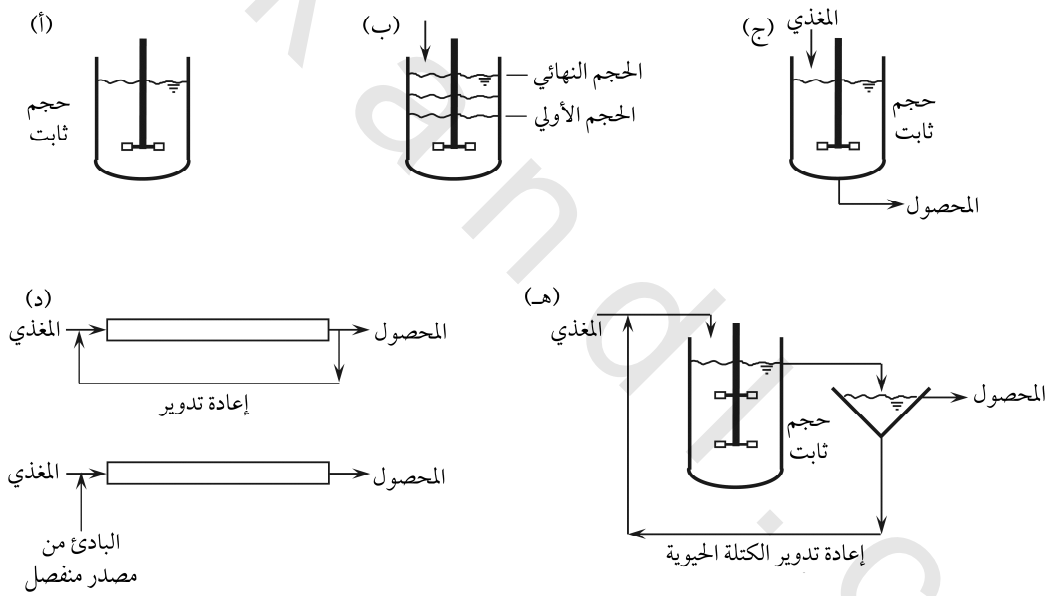
(٣,٣) عملية التخمير Fermentation Process

يمكن إجراء التخميرات الصناعية إما على دفعة واحدة، وإما على عملية تغذية على دفعات، وإما زراعات مستمرة (الشكل رقم ١,٣) [٢]. وعمليات الدفعة الواحدة أو التغذية على دفعات هي الأكثر شيوعاً؛ والتخمير المستمر يكون نادراً نسبياً. وتجرى عادةً معالجة مياه الصرف الصحي بطريقة الحمأة المنشطة كعملية تخمير مستمرة. ويجرى تخمير البيرة ومعظم المضادات الحيوية باستخدام عمليات الدفعة الواحدة أو التغذية على دفعات.

في عمليات الدفعة الواحدة (الشكل رقم ١,٣ أ)، يتم حقن دفعة من بيئة الزراعة في المخمر بسلالة ميكروبية، أو "المزرعة البادئة". ويستمر التخمير لمدة معينة ("وقت الدفعة" أو "وقت التخمير") ويتم حصاد المنتج. ويمتد التخمير أحادي الدفعة عادةً لأكثر من ٤-٥ أيام، ولكن قد تستمر بعض تخميرات المواد الغذائية التقليدية إلى عدة أشهر. وفي تخميرات التغذية على دفعات، تتم إضافة بيئة الزراعة المعقمة إما بشكلٍ مستمر وإما بشكلٍ دوري إلى بيئة التخمير الملقحة (الشكل رقم ١,٣ ب). ويزداد حجم محلول التخمر مع كل إضافة إلى البيئة. ويتم حصاد المزرعة بعد وقت التخمير. ويمكن أن يتغير تركيب بيئة التغذية مع مرور الوقت.

في التخمير المستمر، يتم تغذية المخمر بالبيئة المعقمة باستمرار ويتم سحب منتج التخمير باستمرار، وعليه لا يتغير حجم التخمير (الشكل رقم ١,٣ ج). وعادةً، يبدأ التخمير المستمر بوصفه مزرعة دفعة واحدة وتبدأ

التغذية بعد أن تصل الكثافة الميكروبية (عدد الميكروبات) إلى تركيزٍ معين. وفي بعض التخميرات المستمرة، يمكن إعادة تدوير جزء صغير من المزرعة التي تم حصادها، لتلقيح بيئة التغذية المعقمة الداخلة إلى المخمر باستمرار (الشكل رقم ١ ,٣ د). وتعتمد أهمية التلقيح المستمر على نوع الخلط في المخمر. ويجب تلقيح أجهزة تخمير التدفق المسدود (Plug-flow) مثل الأنابيب الطويلة التي لا تسمح بالخلط الرجعي، باستمرار. وتتصرف عناصر السائل المتحرك عبر جهاز التدفق المسدود مثل مخمرات صغيرة إحادية الدفعة. وعليه، فإن عمليات الدفعة الإحادية الحقيقية يمكن تحويلها بسهولةٍ نسبية إلى عمليات مستمرة في مخمرات التدفق المسدود، وبخاصة إذا لم يكن التحكم في درجة الأس الهيدروجيني والتهوية مطلوباً. وتتعرض زراعات التخمير المستمر بشكلٍ خاص للتلوث الميكروبي، ولكن في بعض الحالات يمكن اختيار ظروف التخمير لصالح الكائنات الدقيقة المطلوبة (على سبيل المثال درجة أس هيدروجيني منخفضة، ودرجة كحول عالية، أو محتوى الملح) بدلاً من أي ملوثات محتملة.



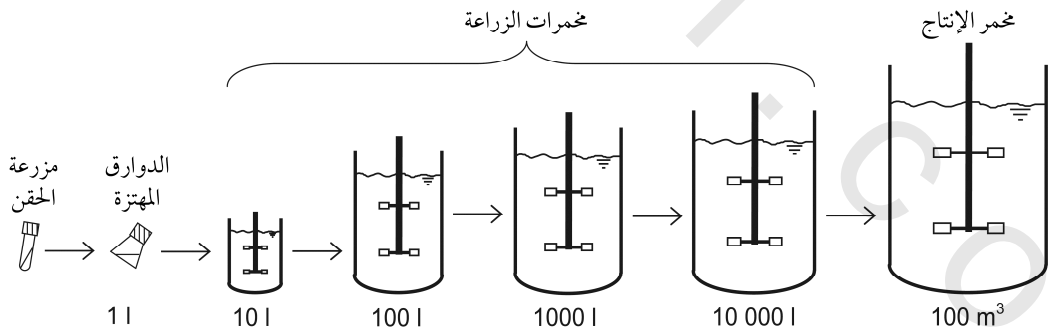
الشكل رقم (١ ,٣). طرق التخمير. (أ) تخمير الدفعة الواحدة؛ (ب) التخمير متعدد الدفعات؛ (ج) التخمير متواصل التدفق ذو الخلط الجيد؛ (د) تخمير التدفق المسدود المتواصل مع وبدون إعادة التدزير؛ (هـ) التخمير المتواصل جيد الخلط مع إعادة تدوير الكتلة الحيوية المركزة.

في مخمر مستمر "جيد الخلط" (الشكل رقم ١ ,٣ ج)، يجب أن يتم ضبط معدل تغذية البيئة بحيث يبقى معدل التخفيف الذي هو نسبة معدل التغذية الحجمي إلى حجم البيئة الثابت، أقل من معدل النمو النوعي الأقصى للكائن الدقيق في البيئة المحددة وتحت ظروف التخمير المحددة. وإذا تجاوز معدل التخفيف معدل النمو النوعي الأقصى

فسوف يتم غسل الكائن الدقيق إلى خارج المخمر. ويتم في بعض التخميرات المستمرة جيدة الخلط تركيز جزء من الكتلة الحيوية في تيار الحصاد وإعادة تدويرها إلى وعاء التخمير (الشكل رقم ١ ,٣ هـ). وتتيح إعادة تدوير الكتلة الحيوية زيادة معدل التخفيف أعلى من القيمة التي من شأنها أن تؤدي إلى غسيل الخلايا خارج المخمر في غياب إعادة تدوير الكتلة الحيوية. ويزيد معدل التخفيف المرتفع من إنتاجية المخمر. وتستخدم عمليات التخمير المستمر جيدة الخلط مع إعادة تدوير الكتلة الحيوية عادة في معالجة مياه الصرف الصحي بطريقة الحمأة المنشطة.

(١ ,٣ ,٣) تحضير اللاقح Inoculum Generation

تكون التخميرات الصناعية غالباً عمليات أحادية الدفعة. وعادةً تستخدم مزرعة بادئة نقية (البادئ)، موضوعة تحت ظروف محكمة بعناية، في حقن أطباق بتري معقمة أو بيئة سائلة في دوارق الهز. وتستخدم المزرعة الأولية بعد النمو الكافي في حقن المخمر البادئ. وحيث إن المخمرات الصناعية يمكن أن تكون كبيرة جداً (على سبيل المثال، ١٥٠–٢٥٠م٣)، فإنه يتم تجهيز اللاقح من خلال مراحل عديدة متتالية، من ٥ إلى ١٠٪ من حجم العمل لمخمر الإنتاج. وتضمن هذه الإستراتيجية الاستخدام الأمثل لمخمر الإنتاج عن طريق تقليل وقت الدفعة في هذا الوعاء. ويوضح الشكل رقم (٢ ,٣) قطار لإنتاج اللاقح لمخمر إنتاج ١٠٠م٣. وتقلل مدة التخمير الطويلة بشكلٍ مفرط (وقت التخمير) من الإنتاجية (أي كمية المنتج المكونة لكل وحدة زمن لكل وحدة حجم من المخمر)، وتزيد التكاليف. وأحياناً يتم نفخ جراثيم اللاقح المنتجة كبادئ، مباشرةً إلى مخمر كبير مع الهواء الداخل. وفي مزارع الخلايا الحيوانية، يتم عموماً تحديد حجم اللاقح ليعطي عدد أولي من الخلايا من ٢–٤ × ١٠٥ خلية/مل.

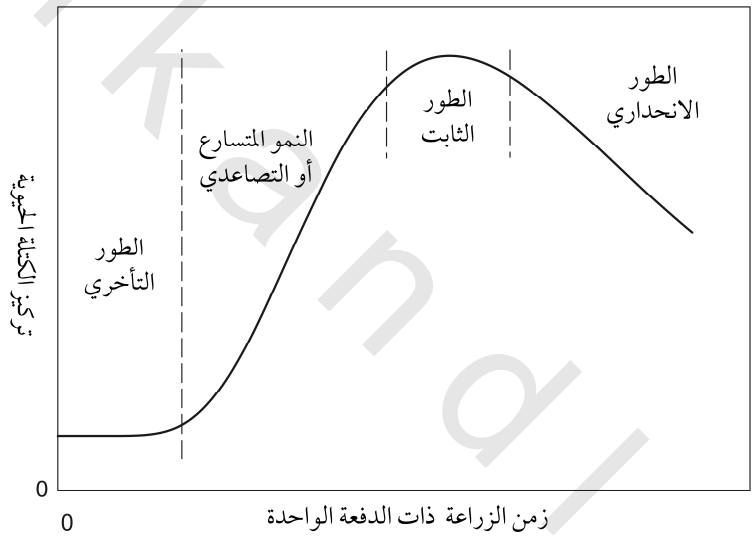


الشكل رقم (٢ ,٣). تحضير اللاقح لمخمر إنتاج كبير.

(٢ ,٣ ,٣) النمو وتكوين المنتج Growth and Product Formation

يتبع النمو الميكروبي في مخمر أحادي الدفعة حديث التلقيح عادةً النمط المبين في الشكل رقم (٣ ,٣). بدايةً، في الطور التأخري لا يزيد تركيز الخلايا كثيراً. ويعتمد طول الطور التأخري على تاريخ نمو اللاقح، وتركيب

البيئة، وكمية المزرعة المستخدمة للتلقيح [٣]. ويقيد الطور التأخري الطويل بشكلٍ مفرط المخمر بصورة غير منتجة، ولذلك ينبغي تقليل طول الطور التأخري. وتتحقق أطوار تأخرية قصيرة في الحالات التالية: تطابق تركيز بيئة الزراعة والظروف البيئية في مزرعة البادئ ووعاء الإنتاج (ومن ثمَّ تقل الحاجة إلى الوقت للتكيف)، وصغر صدمة التخفيف (أي استخدام كمية كبيرة من اللاقح)، وكون خلايا اللاقح في آخر طور النمو الأسي [٣]. ويعد الطور التأخري هو في الأساس مرحلة تكيف في البيئة الجديدة. ويلي الطور التأخري مرحلة النمو الأسي المتسارع، والتي تتزايد خلالها كتلة الخلايا اطرادياً. وفي النهاية حيث يتم استهلاك المواد الغذائية وتتراكم المنتجات الأيضية المثبطة فإن المزرعة تدخل طوراً ثابتاً. وفي نهاية المطاف، يسبب التجويع موت الخلايا وتحللها، وعليه ينخفض تركيز الكتلة الحيوية.



الشكل رقم (٣,٣). مظاهر النمو الرئيسة للكائنات الحية الدقيقة في مزرعة ذات دفعة واحدة مغمورة.

وخلال النمو – المتسارع، يعتمد الوقت المطلوب من قبل الكتلة الحيوية لتتضاعف (وقت التضاعف، t_d) على معدل النمو النوعي (معدل النمو لكل وحدة كتلة الخلية، μ)، على النحو التالي:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \qquad (٣,١)$$

ويظهر الجدول رقم (٣,١) أوقات التضاعف النموذجية لمختلف أنواع الكائنات الدقيقة والخلايا [٣]. تنمو البكتيريا عادةً أسرع من الخمائر، والخميرة تتكاثر بشكلٍ أسرع من الفطريات. ويكون تركيز الكتلة الحيوية الأقصى في التخميرات الميكروبية أحادية الدفعة المغمورة هو عادةً ٤٠–٥٠ كجم/ م^٣ [٢]. ويميل التركيز الأقصى في المزارع المعلقة أحادية الدفعة للخلايا الحيوانية إلى أن يكون حوالي ٤×١٠^٦ خلية/ مل، أو أقل.

الجدول رقم (١ ,٣). أوقات التضاعف النموذجية.

نوع الخلية	وقت التضاعف (t_d)، دقيقة
البكتيريا	٢٠-٤٥
الخميرة	٩٠
الفطريات	١٦٠
البروتوزوا	٣٦٠
الهايبريدوما	٦٣٠-١٢٦٠
الخلايا النباتية	٣٦٠٠-٦٦٠٠

ويمكن للتركيز العالي من وسط التفاعل أن يحد من النمو، مثلاً عن طريق خفض نشاط المياه. علاوةً على ذلك، تحول بعض الأوساط البيئية المعينة دون تكوين المنتج، وفي حالاتٍ أخرى، قد يمنع منتج التخمير نمو الكتلة الحيوية. فعلى سبيل المثال يمكن أن يكون الإيثانول المنتج في تخمير السكر بواسطة الخميرة مثبطاً للخلايا. ويمكن أحياناً مشاهدة أطواراً متعددة للنمو التأخري (النمو الثنائي) عند توافر اثنين أو أكثر من الأوساط البيئية المدعمة للنمو [٣]. وتدخل الخلايا طوراً متأخراً عند استهلاك الوسط الذي يفضل استخدامه أولاً، حتى يتم تجهيز الميكنة الحيوية لاستهلاك الوسط الآخر. ثم يتم استئناف النمو.

ويمكن تصنيف المنتجات الميكروبية إلى منتجات الأيض الابتدائية أو الثانوية. ومنتجات الأيض الابتدائية هي المنتجات التي لا غنى عنها لبقاء الخلايا الميكروبية على قيد الحياة. وعادةً ما يرتبط تخليق منتجات الأيض الابتدائية مباشرةً بمعدل نمو الكتلة الحيوية. وحمض الستريك والأحماض الأمينية هي أمثلة على الأيض الابتدائي. ومنتجات الأيض الثانوية هي المنتجات التي ليست ضرورية للبقاء ولكنها تخدم وظائف مختلفة مفيدة. وتشمل أمثلة منتجات الأيض الثانوية معظم المضادات الحيوية. وغالباً ما يتم إنتاج منتجات الأيض الثانوية بعد توقف النمو. ويمكن أن تكون الظروف المفضلة للنمو مختلفة تماماً عن تلك التي تساعد على إنتاج منتجات الأيض الثانوية. ومن الضروري لنجاح سير عملية التخمير أن يتم فهم العلاقة بين نمو الكتلة الحيوية وتكوين المركب.

(٣ ,٤) تصميم بيئة التخمير Fermentation Medium Design

يجب أن تكون بيئة التخميرة جيدة التصميم غير مكلفة، ومتوفرة بسهولة، وذات جودة ثابتة، ويجب أن تحتوي على جميع العناصر الكيميائية المطلوبة لإنتاج كمية معينة من الكتلة الحيوية والمنتجات الأيضية. في كثيرٍ من الأحيان، تحتوي البيئة على زيادة من المواد المغذية. وتمتلك الكائنات الدقيقة والخلايا الصيغة العامة $CH_xN_yO_z$.

ويوضح الجدول رقم (٢ , ٣) قيم المتغيرات x، y، و z لأنواعٍ شائعة من الخلايا [٣]. ولذلك، يجب أن تحتوي بيئة التخمير على مصادر للكربون والنيتروجين، والأكسجين من أجل دعم النمو وتكوين المنتج. وفي معظم الحالات، يتم توفير الأوكسجين بواسطة التهوية المستمرة لبيئة التخمير. وعادةً ما يوفر الكربون في شكل السكريات أو النشا. ويمكن توفير النيتروجين في شكل أملاح غير عضوية أو مركبات عضوية تحتوي على النيتروجين (على سبيل المثال منتجات تحلل البروتين). وقد تحتاج البيئة إلى المغذيات الدقيقة مثل الفيتامينات. ومن المطلوب وجود كميات ضئيلة من العناصر مثل الفوسفور، والحديد، والزنك، والكبريت.

الجدول رقم (٢ , ٣). قيم المتغيرات x، y، و z.

نوع الخلايا	X	y	Z
الخميرة والبكتيريا	١,٦٥-١,٨٥	٠,١٢-٠,٢٥	٠,٢٦-٠,٥٦
خلايا نباتية مزروعة	١,٦٠-٢,٠٠	٠,١١-٠,١٧	٠,٦٢-٠,٨٣

وقد تكون بيئة التخمير "معرفة أو محددة"، أي أن تركيبها الكيميائي معروف تماماً. وبدلاً من ذلك، قد تكون بيئة التخمير "معقدة"، أو أن تركيبها المحدد غير معروف بالضبط. وغالباً ما تكون البيئات المعتمدة على منتجات طبيعية معقدة مثل دبس السكر أو مستخلص الخميرة غير محددة تماماً من حيث المكونات المحددة التي تحتويها. وتستخدم البيئات المعقدة في الكثير من التخميرات الصناعية لأنها عادةً ما تكون أقل تكلفة من البيئات المحددة. وتستخدم البيئات المحددة في كثيرٍ من عمليات زراعة الخلايا الحيوانية.

وقد تختلف البيئات للحصول على النمو الأمثل وتكوين المنتج. ويتطلب إنتاج منتجات أيضية معينة وجود مركبات مرادفات خاصة في البيئة.

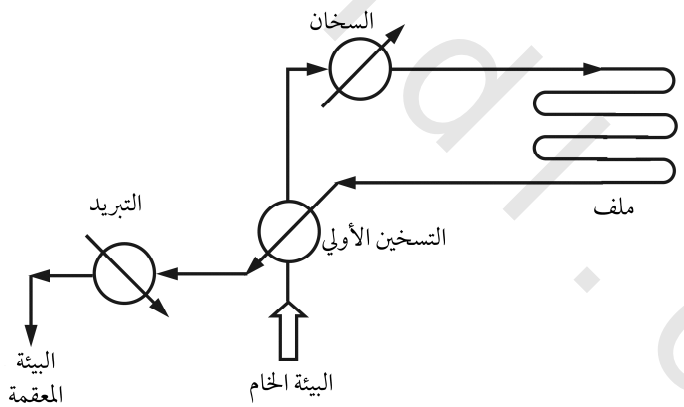
(٣ , ٥) تعقيم الهواء وبيئة التخمير Sterilization of Air and Fermentation Medium

في معظم التخميرات الصناعية، يجب تعقيم البيئة الغذائية وأي هواء يستخدم لإمداد الأوكسجين؛ وذلك لمنع التلوث بالميكروبات غير المرغوب فيها. ويتم تعقيم الهواء دائماً بعملية الترشيح من خلال مرشحات ذات غشاء كاره للماء [٣، ٤]. وتتوافر مرشحات غشائية تحتفظ بالجزيئات الصغيرة حتى ٠,١ ميكرومتر، أو أساساً جميع الكائنات الدقيقة.

ويمكن تعقيم بيئة الزراعة مع المخمر، أو يمكن ملء المخمر سبق التعقيم بدفعة من البيئة الغذائية المعقمة بشكلٍ منفصل. وعادةً ما يتم تعقيم المخمر والبيئة عن طريق التسخين إلى ١٢١ درجة مئوية، والتثبيت في هذه

الحرارة لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة. ويتم تعقيم البيئات الحساسة لدرجة الحرارة التي لا تحتوي على أي مواد صلبة معلقة من خلال الترشيح بواسطة مرشحات غشائية محبة مصنفة بدرجة مطلقة. وعادةً ما يتم تعقيم البيئات التي تستخدم في زراعة الخلايا الحيوانية بالترشيح فائق الغشائية. وفي بعض التخميرات الميكروبية، يمكن تعقيم جزء من البيئة بواسطة الحرارة، ويتم تعقيم المكونات الحساسة للحرارة بشكلٍ منفصل من خلال الترشيح. ويتم ترشيح الماء ومحاليل الأملاح بشكلٍ غير مكلف بالترشيح الفائق.

ويستهلك تعقيم كميات كبيرة من البيئة كدفعة واحدة في المخمر الوقت، لكون عمليات التسخين والتبريد بطيئة. وللتغلب على هذا، غالباً ما تستخدم عملية تعقيم مستمرة (الشكل رقم ٤ ,٣) [٣]. وفي التعقيم المستمر يتم تسخين البيئة الخام من درجة حرارة الغرفة إلى درجة حرارة أعلى قليلاً (التسخين الأولي). وتمر البيئة السابق تسخينها خلال سخان يرفع درجة الحرارة إلى نحو ١٥٠ درجة مئوية. ثم تمر البيئة الساخنة خلال "ملف بقاء"، والذي يضمن بقاء البيئة في درجة حرارة ١٥٠ لبضع ثوان (على سبيل المثال، ٢-٤ ثانية). وعندما تغادر البيئة الساخنة المعقمة ملف البقاء، تنتقل حرارتها من خلال جدار معدني إلى البيئة الخام الواردة في التسخين الأولي (الشكل رقم ٤ ,٣). ويتم تبريد البيئة بعد ذلك إلى درجة حرارة التخمير وتنتقل مباشرةً إلى المخمر والذي تم تعقيمه فارغاً.



الشكل رقم (٤ ,٣). التعقيم المتواصل لبيئة التخمير.

(٦ ,٣) العوامل البيئية Environmental Factors

تتأثر عملية التخمير بفعل عوامل عديدة، وتشمل درجة الحرارة، ودرجة الأس الهيدروجيني، وأيونية المحلول، وطبيعة وتركيب البيئة، والأوكسجين المذاب، وثاني أكسيد الكربون المذاب، ومعدلات الإجهاد في المخمر [٥]. كما تؤثر أيضاً طريقة التشغيل (على سبيل المثال، التغذية أحادية الدفعة، التغذية على دفعات، التغذية

المستمرة، التغذية بالمرادفات) والخلط (التدوير خلال البيئات المختلفة) على التخمير [٢]. وقد تؤثر الاختلافات في هذه العوامل على: معدل التخمر؛ طيف وإنتاجية المنتج، وخصائص المنتج (المظهر، والطعم، والرائحة، والملمس)، و تكوين السموم [٦]؛ والجودة الغذائية والخصائص الفيزيائية الكيميائية الأخرى. ويتم إجراء الكثير من التخميرات الصناعية تحت ظروف محكومة بدرجة عالية من حيث درجة الحرارة، ودرجة الأس الهيدروجيني، والأوكسجين المذاب، وغيرها من العوامل المحتملة. وفي المقابل، تجرى التخميرات الغذائية التقليدية مع الحد الأدنى من التحكم. وتعتمد الظروف الخاصة المطلوبة في عملية التخمير على طبيعة الكائن الدقيق، وطبيعة الوسط البيئي وخصائص المنتج المطلوب.

تعتمد متطلبات التخمير من الأوكسجين على نوع الميكروب، وتركيز الخلايا، ونوع الوسط [٢، ٣]. ويجب على الأقل أن يتساوى الإمداد بالأوكسجين مع الحاجة إليه، أو تصبح عملية التخمير محدودة بالنسبة للأوكسجين. ويصبح من الصعب تلبية الحاجة للأوكسجين في محاليل التخميرات اللزجة والمحاليل التي تحتوي على تركيز كبير من الخلايا المستهلكة للأوكسجين. وكدليلٍ عام، تعتمد قدرة إمداد الأوكسجين في المخمر على معدل التهوية، وقوة التقليب، وخصائص بيئة الزراعة. وفي المخمرات الكبيرة، يصبح انتقال الأوكسجين صعباً عندما يتعدى الطلب ٤–٥ كجم/ م^{٣} في الساعة [٢].

وتحت بعض التركيزات الحرجة للأوكسجين المذاب تصبح كمية الأوكسجين محددة للنمو الميكروبي. ويعتمد مستوى الأوكسجين المذاب الحرج على الكائن الدقيق، ودرجة حرارة البيئة، والوسط الذي يتم أكسدته. وكلما زادت القيمة الحرجة للأوكسجين المذاب، زاد احتمال أن يصبح انتقال الأوكسجين محدِداً. وتحت الظروف التي تستخدم عادةً للزراعة، فإن للفطريات مثل البنسليوم كريزوجينوم والأسبرجلس أوريزي قيم حرجة للأوكسجين المذاب حوالي ٢,٣×١٠$^{-٤}$ كجم/ م^{٣} [٢]. وتكون القيم الحرجة للأوكسجين المذاب لخميرة الخباز وإيشيريشيا القولون ٤,٦×١٠$^{-٥}$ و ٨,١٢×١٠$^{-٥}$ كجم/ م^{٣}، على التوالي [٢].

وتولد جميع التخميرات حرارة. في الزراعات المغمورة، ينتج عادةً ٣–١٥ كيلو واط/ م^{٣} من الحرارة من النشاط الميكروبي [٣]. بالإضافة إلى ذلك، ينتج التقليب الميكانيكي للبيئة ما يصل إلى ١٥ كيلو واط/ م^{٣} [٣]. وعليه، يجب تبريد المخمر لمنع ارتفاع درجة الحرارة والإضرار بالمزرعة. وعادةً ما تكون إزالة الحرارة صعبة، لأن درجة حرارة مياه التبريد تكون أقل بعدد قليلٍ من الدرجات من درجة حرارة بيئة التخمير. وتكون التخميرات الصناعية عادةً محدودة بإمكانية انتقال الحرارة. وتعتمد القدرة على إزالة الحرارة على المساحة المتاحة للتبادل الحراري، والفرق في درجة الحرارة بين البيئة ومياه التبريد، وخصائص البيئة والمبرد، والتيارات في هذه السوائل. وتحدد هندسة المخمر مساحة تبادل الحرارة التي يمكن توفيرها. ولأن توليد الحرارة الأيضية يعتمد على معدل

استهلاك الأوكسجين، فإن إزالة الحرارة في الأوعية الكبيرة (المخمرات) تصبح صعبة كلما اقترب معدل استهلاك الأوكسجين من ٥ كجم/ م٣ في الساعة [٢].

وبالمقارنة مع الزراعات المغمورة، فإن مستويات الكتلة الحيوية في تخميرات الحالة الصلبة تكون أقل عند ١٠-٣٠ كجم/ م٣ [١، ٢]. ومع ذلك ولأن هناك القليل من الماء، فإن توليد الحرارة لكل وحدة من كتلة التخمير يميل إلى أن يكون أكبر بكثير في تخميرات الحالة الصلبة عنه في التخميرات المغمورة [١، ٢]. ويمكن أن ترتفع درجة الحرارة بسرعة بسبب أن هناك القليل من الماء لامتصاص الحرارة. ولوحظ أن توليد الحرارة الأيضية التراكمي في تخميرات الكوجي لمجموعة متنوعة من المنتجات يكون بين ٤١٩-٢٣٨٧ كجم/ كجم من المواد الصلبة [١]. وتخميرات الكوجي هي تخميرات صلبة لفول الصويا أو الحبوب المطبوخة على البخار. وتستخدم هذه التخميرات على نطاقٍ واسع في صناعة منتجات التخمير الآسيوية مثل صلصة الصويا والساكي. وقد لوحظت قيم أعلى تصل إلى ١٣٣٩٨ كجم/ كجم خلال التسميد. وتصل ذروة معدلات توليد الحرارة في عمليات الكوجي إلى أكثر من ٧١-١٥٩ كجم/ كجم في الساعة، ولكن متوسط المعدلات يكون أكثر اعتدالاً من ٢٥-٦٧ كجم/ كجم في الساعة. وسوف تناقش وسائل التحكم في التخميرات الصلبة في أماكن أخرى [١].

(٣,٧) حركية التخمير Fermentation Kinetcis

(٣,٧,١) التخمرات أحادية الدفعة Batch Fermentation

خلال طور النمو المتسارع في مخمر أحادي الدفعة جيد الخلط، يزداد تركيز الكتلة الحيوية مع الوقت على النحو التالي:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \qquad (٣,٢)$$

حيث X هو تركيز الكتلة الحيوية عند الوقت t و μ هو معامل معدل النمو، أو معدل النمو النوعي. ويمكن حساب تركيز الكتلة الحيوية في أي وقت من خلال تكامل المعادلة (٣,٢)؛ وبالتالي،

$$\int_{X_o}^{X} \frac{dX}{X} = \mu \int_{0}^{t} dt \qquad (٣,٣)$$

أو

$$\ln \frac{X}{X_o} = \mu t \qquad (٣,٤)$$

وحيث يكون X_o هو تركيز الكتلة الحيوية في بداية النمو المتسارع. يمكن تحديد معدل النمو النوعي كمنحدر لرسم بياني للجانب الأيسر من المعادلة (٣,٤) ضد الزمن. وفي النمو المتسارع، يمكن تقدير الوقت اللازم لمضاعفة الكتلة الحيوية باستخدام المعادلة (٣,١). ويمكن بسهولة إجراء زراعات الدفعة الواحدة في بيئة معقمة، ولكنه لا تستطيع الحفاظ على معدل نمو مرتفع لفترة طويلة؛ بسبب استنفاذ المغذيات وتراكم النفايات المنتجة.

(٣,٧,٢) الزراعات المستمرة Continuous Culture

يمكن إجراء الزراعات المستمرة في مخمر جيد الخلط أو مخمر التدفق المسدود. وتتم التغذية والحصاد في الزراعات المستمرة بشكلٍ متصل. ويبقى حجم البيئة في المخمر ثابتاً حيث تتطابق معدلات التغذية والحصاد. ويتم المحافظة على بيئة المزرعة في حالة ثابتة. وهذا يسمح بمعدل عالٍ وثابت للإنتاج لفترات طويلة.

في مزرعة مستمرة جيدة الخلط ذات حجم V_L، ويتم تغذيتها بمعدل تدفق حجمي ثابت Q بمحلول مغذٍ ثابت التركيب، يكون توازن الكتلة الحيوية على تخمير كما يلي:

$$\underbrace{V_L\frac{dX}{dt}}_{\text{Change in total amount of biomass in reactor}} = \underbrace{QX_o}_{\text{Inflow of biomass}} - \underbrace{QX}_{\text{Outflow of biomass}} + \underbrace{V_L\mu X}_{\text{Increase in biomass by growth}} \qquad (٣,٥)$$

الزيادة في الكتلة الحيوية عن طريق النمو	التدفق الخارج من الكتلة الحيوية	التدفق الداخل من الكتلة الحيوية	تغير اجمالي الكتلة الحيوية في المفاعل

في المعادلة (٣,٥) يكون X_o هو تركيز الكتلة الحيوية في المحلول المغذي، μ هو معدل النمو النوعي و X هو تركيز الكتلة الحيوية في المخمر جيد الخلط. وعادةً لا يحتوي المحلول المغذي على كتلة حيوية، أي أن، X_o تكون صفر، إلا في البداية. يمكن ترتيب المعادلة (٣,٥) إلى ما يلي:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{Q}{V_L}(X_o - X) + \mu X \qquad (٣,٦)$$

وعند حالة الثبات، لا يتغير تركيز الكتلة الحيوية في المخمر، أي أن،

$$\frac{dX}{dt} = 0 \qquad (٣,٧)$$

وتصبح المعادلة (٣,٦)

$$\frac{Q}{V_L}(X_o - X) = -\mu X \qquad (٣,٨)$$

وتعرف نسبة معدل تدفق المحلول المغذي إلى حجم البيئة V_L في المخمر بمعدل التخفيف، D. وعندما تكون X_o = صفر، الحالة المعتادة، فإن المعادلة (٣,٨) يمكن تبسيطها إلى:

$$D = \mu \qquad (٣,٩)$$

وعليه، في أي مزرعة مستمرة جيدة الخلط تعمل في حالة ثبات بتركيز كتلة حيوية محدود في المخمر، فإن معدل التخفيف يساوي بالضرورة معدل النمو. وإذا تجاوز معدل التخفيف معدل النمو النوعي الأقصى للكائن الدقيق، سوف يتم غسل الكائن الدقيق خارج المخمر، أي أنه، لا يمكن نمو الكتلة الحيوية عند عملية الثبات.

في مخمر التدفق المسدود، طالما أن الظروف تتيح بقاء معدل النمو النوعي ثابتاً، فإن تركيز الكتلة الحيوية عند الخروج من المخمر X_e يعتمد على تخفيف معدل التخفيف D، على النحو التالي:

$$X_e = X_o \exp\left(\frac{\mu}{D}\right) \qquad (٣,١٠)$$

حيث تكون X_o تركيز الكتلة الحيوية في مدخل المخمر، μ هو معدل النمو النوعي و D هو معدل التخفيف. ومن الواضح أن مخمر التدفق المسدود يحتاج إلى التلقيح المستمر (أي أن: X_o > صفر)، وإلا فلن يكون هناك إنتاج للكتلة الحيوية.

(٣,٨) معدات التخمير Fermentation Equipment

(٣,٨,١) التخمير المغمور Submerged Fermentation

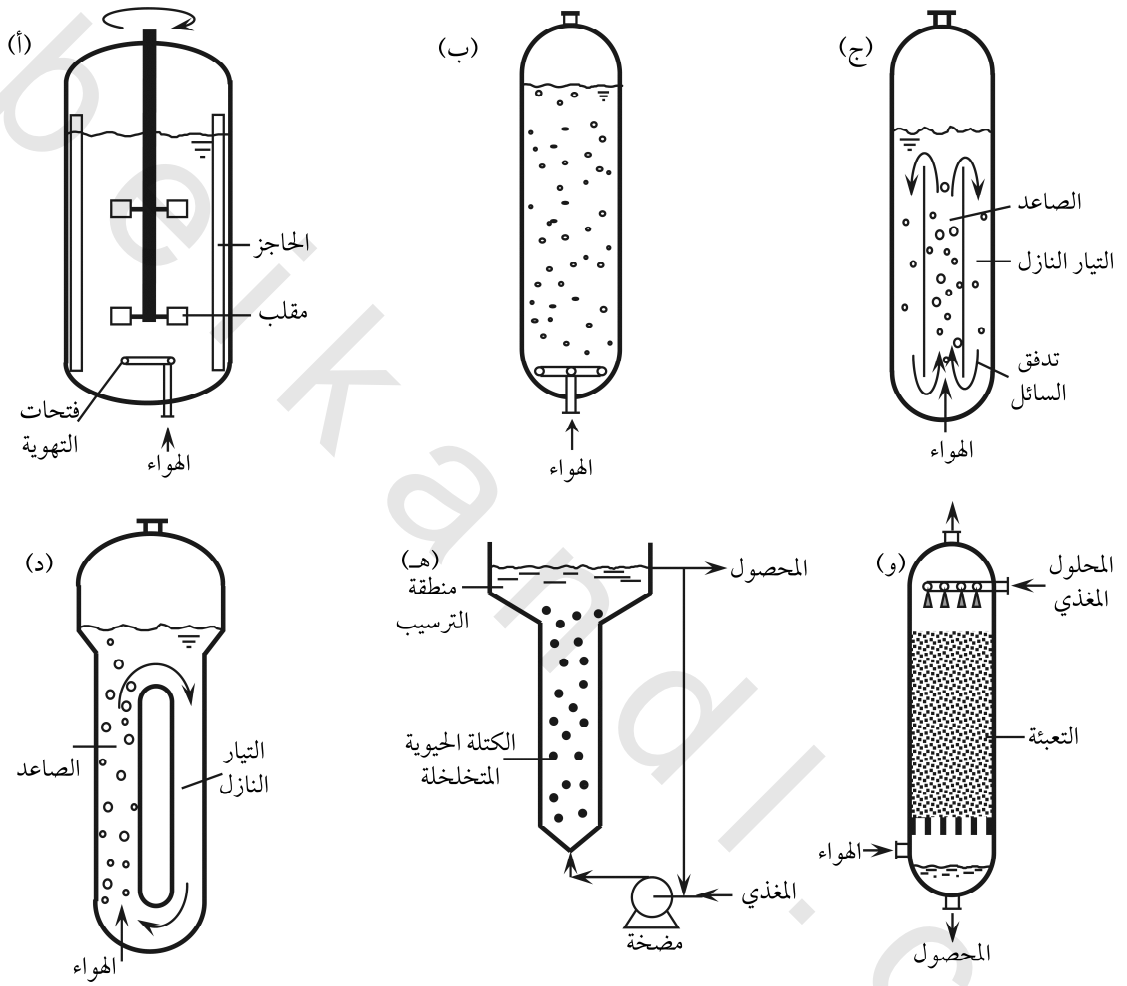
يتم تصميم معدات التخمير المغمور بصفة عامة للمزارع أحادية السلالة، ويمكن أن يتم تعقيمها بالبخار تحت ضغط [٣، ٤]. والأنواع الرئيسة للتخمير المغمور مخمر خزان التقليب (Stirred Tank fermenter)، مخمر عمود الفقاعات (Bubble column)، مخمر الهواء المرفوع (Airlift fermenter)، مخمر الوسادة المعلقة (Fluidized-bed fermenter)، ومخمر الوسادة المتغلغلة (Trickle-bed fermenter)، (الشكل رقم ٣,٥). وفيما يلي مناقشة هذه الأنواع:

(٣,٨,١,١) مخمر خزان التقليب Stirred Tank Fermenter

يعدُّ مخمر خزان التقليب [٣] واحد من أكثر الأنواع استخداماً بسبب مرونته. وهو يتألف من وعاء أسطواني بنسبة عمل من الطول إلى القطر (نسبة جانبية) ٣-٤، مع عمود مركزي والذي يدعم ٣-٤ من قلابات، والتي توضع متباعدة بمقدار قطر واحد للقلاب (الشكل رقم ٣,٥ أ). ويمكن استخدام أنواع مختلفة من القلابات التي توجه اتجاه محورياً (موازياً للعمود المركزي) أو شعاعياً (الخارج من العمود المركزي). وفي بعض

obeikandl.com

الأحيان يتم استخدام القلابات المحورية والشعاعية على نفس العمود. ويتم تزويد الوعاء بأربعة صدادات عمودية موزعة بالتساوي، وتمتد من قرب الجدران إلى الوعاء. وعادةً ما يكون عرض الصداد ٨-١٠٪ من قطر الوعاء.



الشكل رقم (٥ ,٣). مخمرات التخمير المغمور. (أ) مخمر خزان التقليب؛ (ب) مخمر عمود الفقاعات؛ (ج) مخمر الهواء المرفوع ذو الدائرة الداخلية؛ (د) مخمر الهواء المرفوع ذو الدائرة الخارجية؛ (هـ) مخمر الوسادة المعلقة؛ (و) مخمر الوسادة المتغلغلة.

(٢ ,١ ,٨ ,٣) عمود الفقاعات Bubble Column

يتكون من وعاء أسطواني ذي نسبة عمل جانبية ٤-٦ (الشكل رقم ٥ ,٣ ب). ويتم ضخ الهواء فيه من الأسفل، ويقوم الغاز المضغوط بالتقليب. ورغم أنه بسيط، إلا أنه لا يستخدم على نطاقٍ واسع؛ بسبب ضعف

الأداء النسبي مقارنة بالأنظمة الأخرى [٢، ٣]. وهو ليس مناسباً للمحاليل الشديدة اللزوجة أو التي تحتوي على كميات كبيرة من المواد الصلبة [٢، ٣].

(٣,٨,١,٣) مخمر الهواء المرفوع Airlift Fermenter

قـد يأتي تصميم هذه المخمرات على هيئة حلقة داخلية (الشكل رقم ٣,٥ ج) أو خارجيـة (الشكل رقم ٣,٥ د) [٢، ٣]. في التصميم داخلي الحلقة يكون الصاعد الهوائي والهابط اللاهوائي في القشرة نفسها. في التصميم خارجي الحلقة يكون الصاعد الهوائي والهابط اللاهوائي أنابيب منفصلة، والتي تكون مرتبطة بالقرب من القمة والقاع. ويدور السائل بين الصاعد (التدفق لأعلى) والهابط (التدفق لأسفل) وتكون نسبة العمل الجانبية في هذا المخمر ستة أو أكثر. وبشكل عام، فهذه مخمرات عالية القدرة جداً، باستثناء التعامل مع المحاليل شديدة اللزوجة. وقدرتها على تعليق المواد الصلبة، ونقل الأوكسجين والحرارة جيدة. ويكون الإجهاد الهيدروديناميكي منخفض. ويكون استخدام التصميم خارجي الحلقة في الصناعة عادةً قليلاً.

(٣,٨,١,٤) مخمر الوسادة المعلقة Fluidized Bed Fermenter

تشبه هذه المخمرات أعمدة الفقاعات مع مقطع عرضي موسع بالقرب من القمة (الشكل رقم ٣,٥ هـ). ويتم ضخ السائل الطازجة أو المعاد استخدامه باستمرار إلى قاع الوعاء بسرعة كافية لتعليق المواد الصلبة أو المحافظة عليها في معلق. وتحتاج مخمرات القاع المعلق إلى مضخة خارجية. والقسم العلوي الموسع يبطئ السرعة الموضعية في التدفق الصاعد بحيث لا يتم غسل من المواد الصلبة خارج المفاعل الحيوي.

(٣,٨,١,٥) مخمر الوسادة المتغلغلة Trickle-Bed Fermenter

تتكون هذه المخمرات من وعاء أسطواني معبأ بمادة داعمة (على سبيل المثال، نشارة الخشب، الصخور، والهياكل البلاستيكية) (الشكل رقم ٣,٥ و). وتحتوي الدعامة على مسافات كبيرة مفتوحة لتدفق السائل والغاز. وتنمو الكائنات الدقيقة مرتبطة بالدعامة الصلبة. ويتم يتم رش محلول المواد الغذائية السائل من الأعلى والذي يتغلغل خلال الوسادة لأسفل. ويمكن ضخ الهواء لأعلى الوسادة، في اتجاه معاكس لاتجاه السائل. وتستخدم هذه المخمرات في إنتاج الخل، فضلاً عن عملياتٍ أخرى. وهي مناسبة للسوائل ذات اللزوجة المنخفضة وبعض المواد الصلبة العالقة [٢].

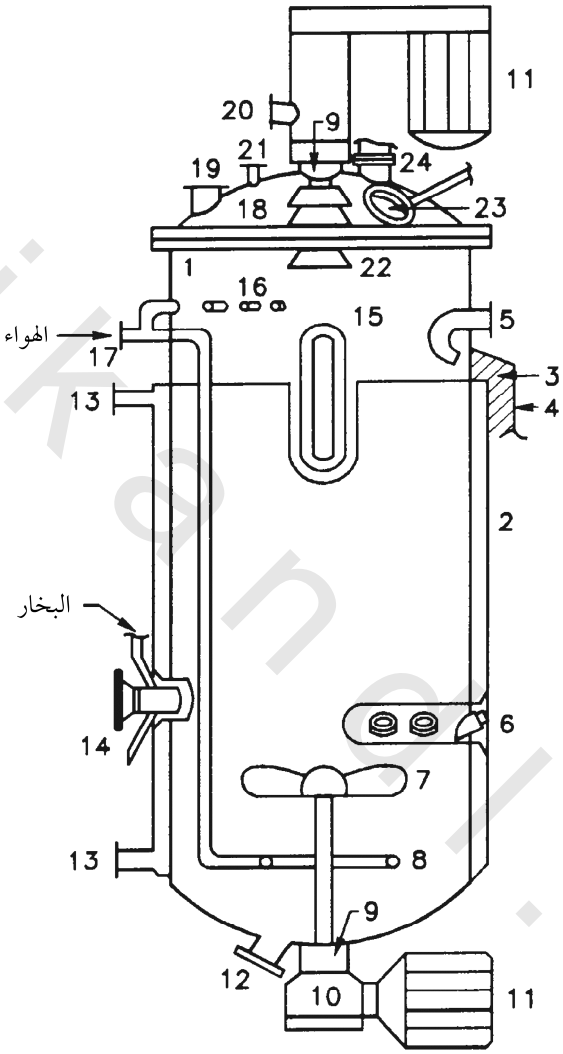
وتشترك جميع المخمرات أو المفاعلات الحيوية للزراعات المغمورة أحادية السلالة في الكثير من السمات، كما هو مبين في الشكل رقم (٣,٦) [٧]. يتم توفير وعاء التخمير بمنافذ جانبية لحساسات درجة الأس الهيدروجيني،

درجة الحرارة، والأوكسجين المذاب. وعادةً ما تستخدم الحساسات القابلة للسحب والتي يمكن استبدالها خلال العملية. وتقع وصلات للحامض والقلوي (للتحكم في درجة الأس الهيدروجيني)، العوامل المضادة للرغوة، واللاقح فوق مستوى البيئة في وعاء المفاعل. ويمكن بسهولة رؤية مستوى السائل من خلال زجاج رؤية لعمودي موجود على جانب الوعاء (الشكل رقم ٦ ,٣). ويقع زجاج رؤية ثانٍ في الجزء العلوي من الوعاء، ويمكن استخدام ضوء خارجي للإضاءة داخل المفاعل الحيوي. ويمكن تنظيف زجاج الرؤية الثاني العلوي داخلياً بواسطة تيار قوي من البخار المتكثف. وقد يوضع الوعاء على خلية تحميل للحصول على مؤشر دقيق لكمية المواد التي يحتوي عليها.

عندما يتم استخدام التقليب الميكانيكي، يمكن استعمال إما مقلب علوي وإما سفلي المدخل. والتصميم ذو المدخل السفلي هو الأكثر شيوعاً ويسمح باستخدام عمود تقليب أقصر، مما يقضي في كثيرٍ من الأحيان على الحاجة إلى دعامات داخل الوعاء. ويتم تزويد عمود المقلب بسدادات ميكانيكية مفردة أو مزدوجة قابلة للتعقيم بالبخار [٧]. وتمنع السدادات التسرب من وعاء التخمير ودخول الملوثات المحتملة من البيئة. ويفضل استخدام السدادات المزدوجة، ولكنها تتطلب التشحيم مع بخار متكثف نظيف مبرد، أو غيرها من السوائل المعقمة. وبدلا من ذلك، وعندما تسمح قيود عزم الدوران، يمكن استخدام مقلبات مقترنة مغناطيسياً ومن ثم القضاء على السدادات الميكانيكية [٧].

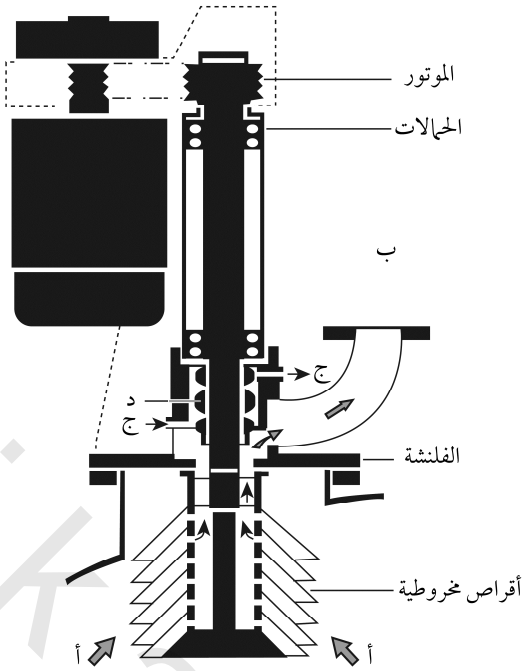
ويوفر ضاخ الهواء (أو غيره من خليط الغاز) إمدادات الأوكسجين (وأحياناً ثاني أكسيد الكربون أو الأمونيا للتحكم في درجة الأس الهيدروجيني) إلى البيئة. وينتج عن تهوية بيئة التخمير رغوة. عادةً، يجب ترك ٢٠-٣٠٪ من حجم المخمر فارغاً لاستيعاب الرغوة والسماح بانسحاب الغاز [٧]. ويتم التحكم في الرغوة في المفاعلات الحيوية عن طريق مزيج من الطرق الكيميائية والميكانيكية. ويتم عادة خلط عوامل كيميائية مضادة للرغوة مع البيئة في بدء التخمير. ويتم إجراء المزيد من الإضافات للعامل المضاد للرغوة من وقتٍ لآخر، كلما دعت الحاجة. ومضادات الرغوة النموذجية هي زيوت السيليكون، الزيوت النباتية، والمواد المعتمدة على بولي (البروبيلين جليكول) أو بولي (الإثيلين جليكول) المنخفض الوزن الجزيئي. وتعدُّ مضادات الرغوة المستحلبة أكثر فعالية؛ لأنها تنتشر بصورة أفضل في المخمر. يمكن أن يتداخل الاستخدام المفرط لمضادات الرغوة مع بعض عمليات الفصل في المصب كما في الترشيح الغشائي. ومضادات الرغوة من السيليكون الكاره للماء تكون مزعجة بشكلٍ خاص؛ لأنها تفسد المرشحات الغشائية وبيئات الفصل اللوني [٣]. ويتم تقليل الاعتماد على مضادات الرغوة الكيميائية من خلال الجمع بينها مع الكسر الميكانيكي للرغوة. ويمكن تركيب "كسار رغوة" ميكانيكي في فراغ الرأس الموجود في المخمر، كما هو مبين في الشكل رقم (٦ ,٣) [٧]. ويفصل الجهاز في الشكل رقم (٦ ,٣) الرغوة – انتشار من الغاز في السائل– إلى مكوناته من خلال العمل الطرد المركزي، كما هو موضح في الشكل رقم

(٣,٧). ويتم التحكم في تشغيل كسار الرغوة وإضافة مضادات الرغوة الكيميائية عبر إشارات من حساس للرغوة يمتد إلى داخل المفاعل الحيوي من الأعلى. ويجب أيضاً سد عمود كسارة الرغوة الميكانيكي عالي السرعة باستخدام سدادات ميكانيكية مزدوجة كما سبق الشرح في المقلب.



الشكل رقم (٣,٦). مخمر الزراعة المغمورة مثالي. (١) وعاء المفاعل؛ (٢) القميص؛ (٣) العزل؛ (٤) الغطاء الحامي؛ (٥) وصلة اللاقح؛ (٦) مداخل حساسات الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والأكسجين المذاب؛ (٧) المقلب؛ (٨) موزع الغاز؛ (٩) العوازل الميكانيكية؛ (١٠) علبة مقلل السرعة؛ (١١) الموتور؛ (١٢) فتحة الحصاد؛ (١٣) وصلات القميص؛ (١٤) صمام أخذ العينة مع وصلة بخار؛ (١٥) زجاج الرؤية؛ (١٦) وصلات للحمض والقاعدة والعامل المضاد للرغوة؛ (١٧) فتحة دخول الهواء؛ (١٨) غطاء قابل للنزع؛ (١٩) فتحة إضافة البيئة؛ (٢٠) فتحة خروج الهواء؛ (٢١) فتحات لحساس الرغوة ومقياس الضغط والمعدات الأخرى؛ (٢٢) كاسر الرغوة الدوار؛ (٢٣) زجاج رؤية ذو إضاءة ووصلة بخار؛ (٢٤) فتحة قرص التمزق.

obeikandl.com



الشكل رقم (٣,٧). كاسر رغوة ميكانيكي. يستخدم الموتور وتركيب الساق لإدارة مجموعة أقراص مخروطية بسرعة عالية. تدخل الرغوة في الفراغات بين الأقراص الدوارة عند (أ) وتفصل إلى غاز وسائل بقوة الطرد المركزي. يدور السائل بسرعة إلى المفاعل الحيوي ويخرج الغاز الخالي من السائل من الفتحة (ب). ويمنع العازل الميكانيكي (د) التسرب إلى ومن المفاعل الحيوي المعقم. ويتم تشحيم العازل بواسطة ماء مبرد معقم (ج).

وفي معظم الحالات، يتم تصميم المفاعل الحيوي لحد أقصى مسموح به من ضغط العمل من ٣,٧٨- ٤,١٠ بار (ضغط مطلق) عند درجة حرارة التصميم من ١٥٠-١٨٠ درجة مئوية [٧]. ويتم تصميم الوعاء ليتحمل الفراغ التام. وفي أمريكا الشمالية يتوافق التصميم مع الجمعية الأمريكية للمهندسين الميكانيكيين (ASME) الباب الثامن، تقسيم ١، رمز الغلايات وأوعية الضغط. وقد تكون رموز أخرى مقبولة في أماكن أخرى. ويمكن تعقيم المفاعل في مكانه-باستخدام بخار مشبع نظيف عند ضغط لا يقل عن ١,٢ بار (ضغط مطلق). ويتم توفير الحماية من الضغط الزائد عن طريق قرص تمزق موجود في أعلى المفاعل الحيوي. ويتصل قرص التمزق بأنابيب تصريف. وعادة يستخدم قرص انفجار غرافيتي؛ لأنه لا يتشقق أو يكون الثقوب قبل فشله تماماً. وتقع أجزاء أخرى على اللوحة الرئيسة للوعاء، وهي فتحات لإضافة البيئة والمحلول المغذي وللحساسات (على سبيل المثال، قطب الرغوة)، والمعدات (على سبيل المثال، عداد الضغط).

ويتم تصميم الوعاء ليتم تصريفه بشكلٍ تام، وتقع فتحة الحصاد في أقل مستوى من وعاء المفاعل (الشكل رقم ٦,٣). ويزود المفاعل إما بصنبور وإما يكون الجزء العلوي قابل للإزالة. ويشيع استخدام لوحات رئيسة

مسطحة في الأوعية الصغيرة، ولكن يكون التركيب المقبب للقمة أقل تكلفة في المفاعلات الحيوية الأكبر (الشكل رقم ٦ , ٣) [٧].

وينبغي أن يحتوي وعاء المفاعل الحيوي على بعض التصاميم الداخلية؛ ينبغي أن يأخذ التصميم في الاعتبار احتياجات التنظيف-في-المكان [٧-٩] والتعقيم-في-المكان. يجب أن يكون هناك حد أدنى لعدد المنافذ، الفتحات، التوصيلات، والمرفقات الأخرى التي تتسق مع الاحتياجات الحالية والمستقبلية المتوقعة للعملية. يجب أن يكون المفاعل الحيوي خالياً من الشقوق والمناطق الراكدة، حيث قد تتراكم جيوب من السوائل والمواد الصلبة. ومن المهم أيضاً الاهتمام بتصميم هذه البنود التي تبدو غير مهمة مثل أخاديد الطوق [٧]. ويفضل استخدام قنوات سهلة نظيفة ذات حواف دائرية . وبقدر الإمكان، يجب استخدام المفاصل الملحومة لتفضيل التوصيلات الصحية. وينبغي أن تسمح توصيلات البخار بالنزوح الكامل لجميع جيوب الهواء في الوعاء والأنابيب المرتبطة بها، من أجل التعقيم. حتى من الخارج ينبغي أن يصمم موقع العمليات الحيوية بدرجة نظيفة، حواف ناعمة، الحد الأدنى من المواضع العارية، وهكذا دواليك.

يتم تغليف وعاء المفاعل بشكل ثابت. في غياب المتطلبات الخاصة، يتم تصميم الغلاف بنفس مواصفات الوعاء [٧]. ويتم تغطية الغلاف بطبقة عازلة من ألياف الزجاج الخالية من الكلور، والتي تكون مغلفة بالكامل داخل غطاء للحماية كما هو مبين في الشكل رقم (٦ , ٣). ويتم تزويد الغلاف بحماية ضد الضغط الزائد من خلال صمام الإغاثة الموجود على الغلاف أو الأنابيب المرتبطة به [٧].

بالنسبة للغالبية العظمى من التطبيقات، يفضل استخدام الفولاذ الأوستنيتي المقاوم للصدأ كمواد بناء المفاعلات الحيوية [٧]. وعادة ما يصنع وعاء المفاعل الحيوي من الفولاذ المقاوم للصدأ من نوع ٣١٦ل، في حين يتم استخدام الأنواع نوع الأقل تكلفة ٣٠٤ (أو ٣٠٤ل) للغلاف، طبقة العزل، وغيرها من الأسطح غير المتصلة بالمنتج. وتحتوي درجات الفولاذ المقاوم للصدأ من الدرجة ل على أقل من ٠,٠٣٪ من الكربون، مما يقلل من تكوين كربيد الكروم خلال عملية اللحام ويقلل من احتمالات التآكل الحبيبي الداخلي في اللحامات [٧]. وينبغي أن تكون لحامات الأجزاء الداخلية أن تكون مع متساوية مع السطح الداخلي ومصقولة. ويصعب ملاحظة اللحامات في التركيبات عالية الجودة.

بالإضافة إلى مواد البناء، يتطلب إنهاء الأسطح الداخلية (اللمسات الأخيرة) أيضاً الاهتمام. يؤثر إنهاء الأسطح التي بالمواد المنتجة، وإلى حدٍ ما، إنهاء الأسطح الخارجية على القدرة على التنظيف، تطهير وتعقيم المفاعل الحيوي، ومنطقة التجهيز العامة [٧]. ويؤثر إنهاء الأسطح في استقرار وتفاعل السطح، وقد يكون له آثار عملية متصلة بالتصاق الخلايا الميكروبية أو الحيوانية على الأسطح.

يعد إنهاء رقاقات أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ بالطحن غير مرضي للاستخدام في المفاعلات الحيوية [٧]. فعلى الأقل، ينبغي أن يحصل السطح على صقل ميكانيكي. ويتحقق الصقل الميكانيكي من خلال عمل جلخ من مادة مصنفرة على معدن. ويمكن أن يتم تحديد إنهاء السطح برقم الحبيبات (Grit number)، فعلى سبيل المثال، صقل الحبيبات ٢٤٠، والذي يشير إلى كمية الجسيمات في البوصة المربعة على لوحة التجليخ [٧]. وكلما ارتفع عدد الحبيبات كان الإنهاء ناعماً. وتعتمد مزيد من التدابير الكمية لإنهاء الأسطح على القياس المباشر للخشونة من حيث "متوسط الخشونة الحسابي، Ra"، أو "الجذر التربيعي لمتوسط الخشونة". ويكشف الفحص المجهري حتى لسطحٍ ناعم للغاية مصقول ميكانيكياً عن نمط نموذجي للأخاديد والتلال التي توفر مواقع للارتباط الميكروبي. على سبيل المثال، فإن سطح مصقول بدرجة تلميع حبيبات ٣٢٠ سوف يكون له Ra في الرتبة من ٠,٢٣–٠,٣٠ ميكرومتر. ومن ثمَّ، للأسطح الداخلية للمفاعلات الحيوية، يفضل صقل الأسطح كهربائياً عن الصقل الميكانيكي وحده [٧].

ينتج من الصقل الكهربائي، والذي هو عملية تحليل كهربائية تزيل بشكلٍ مفضل نتوءات السطح المجهرية الحادة الناشئة عن التلميع الميكانيكي، إنهاء أكثر نعومةً [٧]. ويقلل الصقل الكهربائي بدرجةٍ كبيرة مساحة سطح المعدن، ومن ثمَّ، مساحة الاتصال بين المنتج والمعدن. وتضفي المعالجة مقاومة الفولاذ المقاوم للصدأ للتآكل؛ وذلك بإزالة المناطق المجهرية ذات الإجهاد المحلي العالي؛ وتخلق تخميل سطح الصلب، غني بأكسيد الكروم الواقي [٧]. ولتحقيق إنهاء سطح مصقول كهربائياً مناسباً، يجب أن يكون السطح قد سبق صقله ميكانيكياً، ولكن هناك القليل من المزايا للبدء بسطح مصقول بدرجة صقل حبيبات أفضل بكثير من ٢٢٠ (Ra = ٠,٤–٠,٥ ميكرومتر).

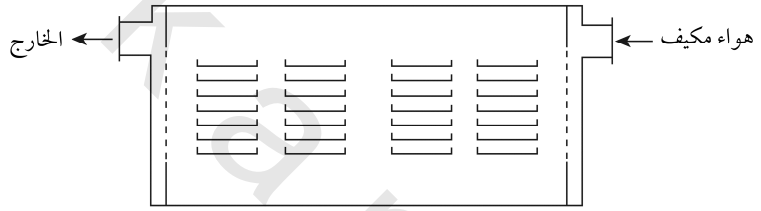
وإذا توجب استخدام الصقل الميكانيكي فقط، ينبغي أن يكون بدرجة لا تقل عن صقل حبيبات ٢٤٠، وينبغي التحكم في اتجاه الصقل لإنتاج تجزع رأسي من أجل صرف أفضل [٧]. وينبغي أن يحصل السطح كحدٍ أدنى على معالجة بغسيل حمض النيتريك. ويبدو أن اتجاه التجزع يكون غير مهماً إذا كان السطح سوف يتم صقله كهربائياً.

(٣,٨,٢) التخمير الصلب Solid-State Fermentation

تتراوح أجهزة التخمير الصلب [٢،١] في التطور التقني من لفائف ورق الموز البدائية جداً، سلال الخيزران، وأكوام الوسط إلى الآلات المؤتمتة للغاية خاصةً في اليابان، وبعض أنظمة التخمير "الأقل تعقيداً"، على سبيل المثال، تخمير حبوب الكاكاو في الأكوام، ذات فعالية لا بأس بها في المعالجة على نطاق واسع. في المقابل، فإن بعض تخميرات صلصة الصويا المستمرة عالية الميكنة، والتي أثبتت نجاحها في اليابان لا تناسب مع المواقع الأقل تقدماً في آسيا. وتظهر الأشكال (٣,٨–١٣,٣) بعض التخميرات الصلبة شائعة الاستخدام. وفيما يلي مناقشة هذه الأنواع:

(١ , ٢ , ٨ , ٣) المخمر ذو الأدراج Tray Fermenter

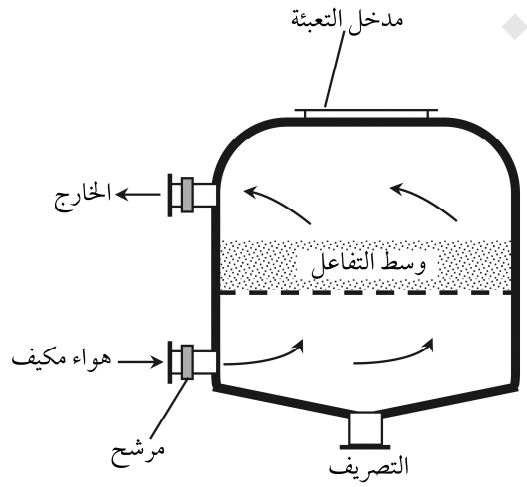
وهي مخمرات بسيطة وتستخدم على نطاقٍ واسع في عمليات الكوجي الصغيرة والمتوسطة المستوى في آسيا [١، ٢]. يتم صناعة أدراج من الخشب، المعدن، أو البلاستيك، وكثيراً ما تكون مثقوبة أو تيم تمديد شبكة أسلاك في الأسفل لتحسين التهوية. ويتم تخمير الوسط البيئي في طبقات ضحلة (عمق ≤ ١٥ , ٠ م). وقد تكون الأدراج مغطاة بقطعة من قماش الجبن للحد من التلوث. وتكون العملية غير معقمة. ويمكن أن يوجد درج مفرد أو أدراج مرصوصة أو مكدسة في غرف يتم التحكم في درجة الحرارة والرطوبة بها (الشكل رقم ٨ , ٣)، أو ببساطة في مناطق جيدة التهوية [١، ٢]. ويتم التلقيح وأحياناً الخلط يدوياً. وفي بعض الأحيان، يتم التعامل مع الأدراج، التعبئة، التفريغ، والغسيل بطريقة أوتوماتيكية. وعلى الرغم من بعض الأتمتة، تتطلب مخمرات الأدراج عمالة مكثفة، ومساحة كبيرة. ولدى مخمرات الأدراج قابلية محدودة لزيادة المستوى.



الشكل رقم (٨ , ٣). المخمر ذو الأدراج.

(٢ , ٢ , ٨ , ٣) المخمر الوسادة الثابتة Static Bed Fermenter

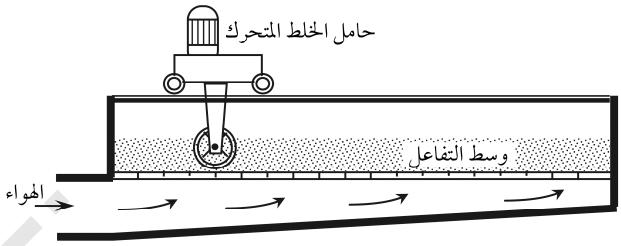
يعدُّ هذا المخمر تعديل أو تكييف لمخمر الأدراج. ويستخدم وسادة ثابتة واحدة، أكبر وأعمق، تقع في غرفة معزولة (الشكل رقم ٩ , ٣) [١، ٢]. ويتم توفير الأوكسجين بواسطة التهوية القسرية خلال وسادة الوسط.



الشكل رقم (٩ , ٣). مخمر الوسادة الثابتة.

(٣,٨,٢,٣) المخمر ذو النفق Tunnel Fermenter

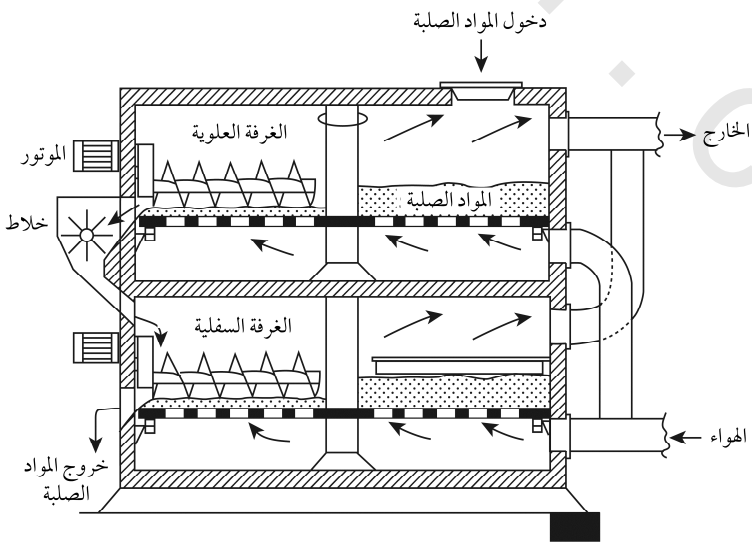
يعدُّ هذا المخمر تعديل لمخمر الوسادة الثابتة. عادةً، تكون وسادة المواد الصلبة طويلة، ولكن ليست أكثر عمقاً من ٠,٥ متر (الشكل رقم ٣,١٠) [١، ٢]. وقد تكون مخمرات الأنفاق عالية الأتمتة مع آليات للتلقيح، الخلط، التغذية المستمرة، وحصاد الوسط [١، ٢].



الشكل رقم (٣,١٠). المخمر ذو النفق.

(٣,٨,٢,٤) مخمر القرص الدوار Rotary Disk Fermenter

يتكون مخمر القرص الدوار [١، ٢] من غرفتين علوية وسفلية، كلٍ منها مزود بقرص دائري مثقب لتدعيم وسادة الوسط (الشكل رقم ٣,١١). ويقوم عمود مركزي عام بتدوير الأقراص. ويتم إدخال الوسط بعد تلقيحه في الغرفة العلوية، ويتحرك ببطء عبر اللولب الناقل. وينقل اللولب العلوي المواد الصلبة المخمرة جزئياً خلال خلاط، إلى الغرفة السفلية حيث يستمر التخمير. ويتم حصاد الوسط المخمر باستخدام اللولب الناقل السفلي. ويتم تهوية كلا الغرفتين بهواء رطب وذو درجة حرارة معينة، تستخدم مخمرات الأقراص الدوارة في صناعة الكوجي على النطاق الواسع في اليابان.

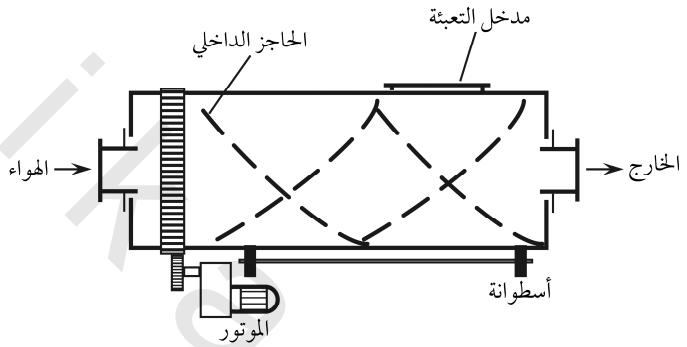


الشكل رقم (٣,١١). مخمر القرص الدوار.

obeikandi.com

(٣,٨,٢,٥) مخمر البرميل الدوار Drum Rotary Fermenter

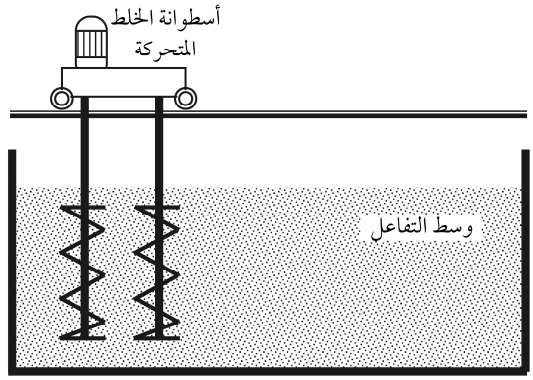
يتم تدعيم البرميل الأسطواني لمخمر البرميل الدوار [١، ٢] على بكرات، ويتم تدويره (١–٥ لفة في الدقيقة) حول المحور الطويل (الشكل رقم ٣,١٢). وقد يكون الدوران على فترات متقطعة، ويمكن أن تختلف السرعة مع مرحلة التخمير. وتساعد صدادات مستقيمة أو منحنية داخل البرميل في تراجع الوسط، ومن ثمَّ تحسين التهوية والتحكم في درجة الحرارة. وفي بعض الأحيان يكون البرميل مائلاً، مما يسبب انتقال الوسط من مدخل الطرف العلوي إلى مخرج الطرف السفلي أثناء الدوران. وتتم التهوية من خلال مدخل محوري وفتحات العادم.



الشكل رقم (٣,١٢). مخمر البروميل الدوار.

(٣,٨,٢,٦) مخمر الخزان المقلب Agitated Tank Fermenter

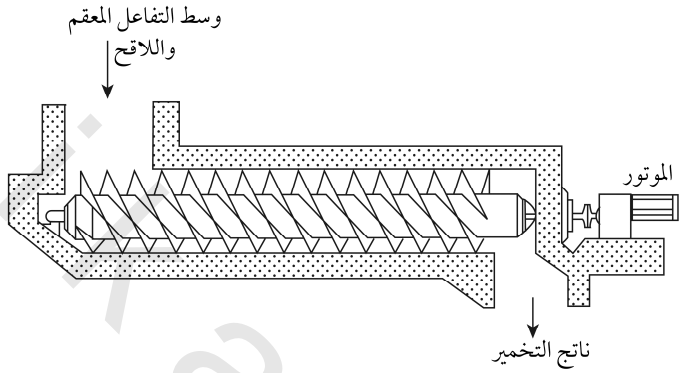
يتم تركيب إما واحد وإما أكثر من القلابات اللولبية في خزانات أسطوانية أو مستطيلة لتقليب وسط التخمير (الشكل رقم ٣,١٣). أحياناً، تمتد اللوالب إلى خزانات من عربات متحركة والتي تقع على قضبان أفقية فوق الخزانات. وتصميم آخر للخزان المقلب هو مخمر المجداف. ويشبه هذا جهاز البرميل الدوار، إلا أن البرميل يكون ثابتاً، ويتم توفير الخلط الدوري بواسطة مجاديف معتمدة على محرك ومدعمة على عمود مركزي [١، ٢].



الشكل رقم (٣,١٣). مخمر الخزان المقلب.

(٣,٨,٢,٧) مخمر اللولب المستمر Continuous Screw Fermenter

يتم التغذية بالوسط المعقم المبرد، والذي تم تلقيحه في مدخل الغرفة غير المهواة (الشكل رقم ١٤,٣). ويتم نقل المواد الصلبة المتخمرة في اتجاه منفذ من خلال اللولب (الشكل رقم ١٤,٣). وتتحكم السرعة الدورانية وطول اللولب في وقت التخمير. وتناسب مخمرات اللولب المستمر التخميرات اللاهوائية المستمرة أو التخميرات المفضلة لكميات دقيقة (ضئيلة جداً) من الهواء [١، ٢].



الشكل رقم (١٤,٣). مخمر اللولب المستمر.

وعلى عكس الزارعات المغمورة، لا يؤخذ تصميم أوعية الضغط معياراً في المخمرات الصلبة. ويمكن أن يتم تبطين غرف كبيرة من الخرسانة أو الطوب، غرف الكوجي، مع الصلب، وعادةً الفولاذ المقاوم للصدأ من نوع ٣٠٤. ومع ذلك، تستخدم أيضاً الأنواع الأكثر مقاومة للتآكل من الفولاذ المقاوم للصدأ من نوع ٣٠٤ ل و ٣١٦ ل.

(٣,٩) استعادة منتجات التخمير Recovery of Fermentation Products

يحتاج المحلول الناتج من التخمير مزيد من المعالجة النهائية من أجل استرداد المنتج المطلوب في جالة نقية مناسبة. وتتكون المعالجة النهائية عادةً من سلسلة من الخطوات التي تقدم في نهاية المطاف المنتج على المطلوب المستوى من النقاء. وسوف يتم مناقشة عمليات التجهيز النهائية ببعض التفصيل في الفصل الثامن. ويقتصر هذا النقاش على العوامل التي يجب النظر فيها عند تطوير برامج تنقية وتركيز لأي منتج هام اقتصادياً، اعتماداً على الاختيار الصغير من عمليات التجهيز الكثيرة المتاحة [١٠]. وغالباً ما يساهم استرداد المنتج وتنقيته بحوالي ٧٠-٨٠٪ من التكلفة النهائية لإنتاج منتجٍ ما [١٠]؛ وعليه، يجب الاهتمام بتصميم استرداد نهائية اقتصادية. وتعدُّ تنقية المنتج لمستوى أكثر من المستوى المطلوب في تطبيقٍ معين هو إسراف ومكلف. ويجب تحديد مواصفات نقاوة واقعية والتي تتفق مع الاستخدام المقصود، وكذلك التقيد بها في عمليات المعالجة النهائية.

ويجب تحقيق درجة النقاوة والتركيز المطلوبين، إلى أقصى حدٍ ممكن، بأقل عدد من خطوات التجهيز؛ عادة، يستخدم ما لا يزيد عن ٦-٧ خطوات تجهيز في استرداد منتجات التخميرات الصناعية [١٠]. ويقلل استخدام الحد الأدنى من خطوات المعالجة من مصاريف رأس المال ونفقات التشغيل. وعلاوة على ذلك، فإن استخدام عدد كبير من خطوات التجهيز يقلل من العائد الإجمالي للعملية. وذلك لأن العائد الإجمالي لعملية من عدد n- من الخطوات بعائد للخطوة x٪ يكون فقط $(x/100)^n$. على سبيل المثال، فإن قطار تجهيز من خمس خطوات فقط، كلٍ منها بعائد ٩٠٪، قد يخفض الاسترداد الإجمالي لأقل من ٦٠٪ [١١]. ويقلل استخدام الفصل عالي الجودة مثل الفصل اللوني مبكراً في عملية الاسترداد من فقدان العائد.

وينبغي بذل محاولات لتركيز الجزء المحتوي على المنتج من المحلول في أقرب وقت ممكن خلال عملية التجهيز النهائي [١٠]. وذلك يقلل من حجم وتكلفة المعدات المطلوبة لخطوات التجهيز اللاحقة. ويمكن أن تكون محاليل التخمير لزجة جداً، وعليه، من الصعب ضخها، خلطها وترشيحها. ويسهل تقليل لزوجة المحلول كثيراً من التجهيز، على سبيل المثال، عن طريق هضم أي بوليمرات غير مرغوب فيها وإزالة أي مواد صلبة معلقة لا حاجة لها. وينبغي أن تصمم عملية التجهيز النهائي بحيث تزيد من سرعة التجهيز [١٠]. فالتجهيز السريع يقلل من المصاريف المرتبطة مع مرور الوقت ويقلل من فقدان المنتج المرتبط بالتعرض إلى ظروف المعالجة السلبية لفتراتٍ طويلة في كثيرٍ من الأحيان.

وتعتمد عمليات الاسترداد والفصل على اختلافات الخصائص المادية والكيميائية لمكونات الخليط، للفصل بينهما. على سبيل المثال، يعتمد استرداد الخلايا من المحلول بالترشيح على الفرق بين حجم الخلايا وحجم جزيئات السائل؛ وذلك لتحقيق الفصل. عموماً، يتم تحقيق أفضل نتائج الفصل الكلي إذا اعتمدت الخطوات الفردية التي تستخدم في عملية التجهيز النهائي على أكبر عدد ممكن من الاختلافات في الخصائص المادية والكيميائية لتحقيق الفصل [١٠]. كمثال لذلك، عند استخدام خطوتين متعاقبتين من الفصل اللوني، ترشيح الهلام الذي يفصل بناءً على الحجم الجزيئي، والفصل اللوني التبادلي للأيونات الذي يفصل على أساس الاختلاف في شحنة الجزيئات، فإن استخدام تركيبة منهما قد يكون متفوقاً مقارنةً باستخدام مرحلتين من الفصل اللوني الأيوني التبادلي.

(١٠, ٣) ملاحظات ختامية Concluding Remarks

قدم هذا الفصل لمحة عامة عن تقنية التخمير المستخدمة في العمليات الصناعية. ويمكن أن تكون عملية التخمير متنوعة للغاية اعتماداً على الوسط، الكائن الحي الدقيقة، والمنتج. وتتم معظم عمليات التخمير الصناعية على دفعة واحدة أو بالتغذية على دفعات، ولكن يمكن استخدام طرق أخرى من التخمير. وتتطلب الإدارة

الناجحة لعملية التخمير الاهتمام بالتصميم والمعالجة الأولية لبيئة التخمير، وتجهيز اللاقح، والظروف البيئية اللازمة للنمو وتكوين المنتج. كما يجب الاهتمام في التخميرات أحادية السلالة بمنع التلوث الميكروبي. وعلى الرغم من أن مخمرات خزان التقليب يشيع استخدامها في التخميرات المغمورة، فإنه تتواجد أنواع كثيرة مختلفة من المخمرات. ويجب اختيار المخمر المناسب بالإشارة إلى طبيعة التخمير، وحجم العملية، والقضايا الهندسية والتشغيلية المعنية.

المراجع References

[١] Chisti, Y. (1999) Solid substrate fermentations, enzyme production, food enrichment, in *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, vol. **5** (eds M.C. Flickinger and S.W. Drew), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 2446–2462.

[٢] Chisti, Y. (1999) Fermentation (industrial): basic considerations, in *Encyclopedia of Food Microbiology* (eds R. Robinson, C. Batt, and P. Patel), Academic Press, London, pp. 663–674.

[٣] Chisti, Y. and Moo-Young, M. (1999) Fermentation technology, bioprocessing, scale-up and manufacture, in *Biotechnology: The Science and the Business*, 2nd edn (eds V. Moses, R.E. Cape, and D.G. Springham), Harwood Academic Publishers, New York, pp. 177–222.

[٤] Chisti, Y. (1992) Assure bioreactor sterility. *Chem. Eng. Prog.*, **88** (9), 80–85.

[٥] Chisti, Y. (1999) Shear sensitivity, in *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, vol. **5** (eds M.C. Flickinger and S.W. Drew), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 2379–2406.

[٦] Chisti, Y. (1998) Biosafety, in *Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook*, vol. **2** (ed. G. Subramanian), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 379–415.

[٧] Chisti, Y. (1992) Build better industrial bioreactors. *Chem. Eng. Prog.*, **88** (1), 55–58.

[٨] Chisti, Y. and Moo-Young, M. (1994) Clean-in-place systems for industrial bioreactors: design, validation and operation. *J. Ind. Microbiol.*, **13,** 201–207.

[٩] Chisti, Y. (1999) Modern systems of plant cleaning, in *Encyclopedia of Food Microbiology* (eds R. Robinson, C. Batt, and P. Patel), Academic Press, London, pp. 1806–1815.

[١٠] Chisti, Y. (1998) Strategies in downstream processing, in *Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook*, vol. **2** (ed. G. Subramanian), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 3–30.

[١١] Fish, N.M. and Lilly, M.D. (1984) The interactions between fermentation and protein recovery. *Biotechnology*, **2,** 623–627.

obeikandl.com

الفصل الرابع

التطور الموجه للمحفزات الحيوية الصناعية

DIRECTED EVOLUTION OF INDUSTRIAL BIOCATALYSTS

مارلين شميدت، دومينيك بوتشر، أوفي بورنشويار

Marlen Schmidt, Dominique Böttcher, and Uwe T. Bornscheuer

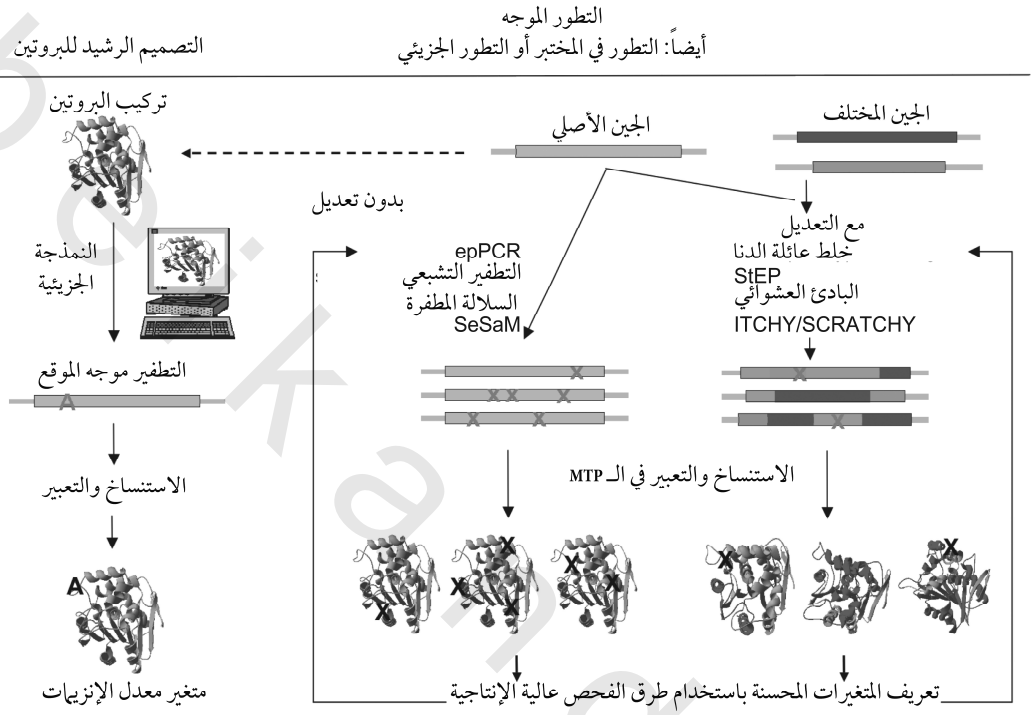
(١ , ٤) المقدمة Introduction

تستخدم المحفزات الحيوية على نطاقٍ واسع في الإنتاج الصناعي للمواد الكيميائية الضخمة والدوائية وقد تم تطبيق أكثر من ٣٠٠ عملية في الصناعة [١-٤]. وحتى الآن، فإن معظم تطبيقات الإنزيمات تشمل استخدام الهيدروليزات. ومع ذلك، فمن المتوقع أن يتغير ذلك في المستقبل القريب، حيث أصبحت المحفزات الحيوية من فئات الإنزيمات الأخرى (على سبيل المثال، الليبيزات، والأوكسيدوريداكتيزات) موضع البحث المكثف في العقد الماضي وقد تم القيام بالكثير من الاكتشافات الكبرى بالفعل.

بغض النظر عن نظام التفاعل والإنزيم اللذان يتم بحثهما لعملية تحفيز حيوية معينة، فإن الإنزيمات في كثيرٍ من الأحيان لا تلبي متطلبات التطبيقات على المستوى الكبير كما أنه يجب تحسين خصائصها. ويشمل هذا عادةً الانتقائية الكيميائية، والتجسيمية، وخاصةً الفراغية للمحفز الحيوي، وأيضاً الجوانب المتصلة بالعملية مثل الثبات طويل المدى عند درجات حرارة معينة أو درجة أس هيدروجيني والنشاط في وجود تركيزات كبيرة من وسط التفاعل التي تحتاج إلى تحسينها لتحقيق أعلى إنتاجية.

بالإضافة إلى الإستراتيجيات الكلاسيكية مثل التقييد، والإضافات، أو هندسة العمليات، فإن تقنيات البيولوجيا الجزيئية تعد الآن أهم المنهجيات المستخدمة لتصميم الإنزيمات بطريقة تفصيلية للعمليات المعينة. وتستخدم إستراتيجيتين مختلفتين (ولكن عادةً مكملتين): تصميم البروتين الرشيد، والتطور (الجزيئي) الموجه. ويتم توضيح المخطط العام لهذه المناهج في الشكل رقم (١ , ٤). ويركز هذا الفصل على الإنجازات الكبرى التي تمت في العقد الماضي في مجال التطور الموجه، ولكن أيضاً يتم ذكر تصميم البروتين الرشيد. وتشمل الأمثلة المغطاة

العمليات الصناعية وكذلك المساهمات المهمة من البحوث الأكاديمية التي تتعامل مع المحفزات الحيوية ذات الصلة. وكما يمكن أن نتوقع فأنه لم يتم نشر جميع تحسينات المحفزات الحيوية التي تمت في الصناعة، فمن المتوقع أن توجد عدة عمليات أخرى تستخدم الإنزيمات المحسنة بواسطة أساليب التطور الموجه.



الشكل رقم (١ , ٤). مقارنة تخطيطية لتصميم البروتين الرشيد والتطور الموجه. يبدأ التصميم الرشيد من تركيب البروتين (أو نموذج التماثل)، والذي يتم عن طريقه تعريف مجموعات الأحماض الأمينية المهمة. ويتم إدخال هذه المجموعات على مستوى الجين ويتم إنتاج الطفرة الناتجة والتحقق من الخصائص المطلوبة. يبدأ التطور الموجه من جين أو عدة جينات (مماثلة)، والتي تخضع لمجموعة من أساليب الطفرات العشوائية. ومن مكتبات الطفرات الناتجة أو الـ Chimeras يتم تعريف المتغيرات المطلوبة، بعد الإنتاج على مستوى أطباق التركيز الدقيق، بواسطة الفحص أو الاختيار. راجع المتن للاختصارات.

(٤ , ٢) إستراتيجيات تصميم البروتين Strategies for Protein Design

(٤ , ٢ , ١) التصميم الرشيد للبروتين Rational Protein Design

إن فهمنا المتزايد لكيفية هندسة خصائص الإنزيمات يجعل التصميم الرشيد للبروتين أكثر كفاءة بشكلٍ مطرد (الشكل رقم ١ , ٤). ومع ذلك، لا تزال العقبات الرئيسة لتصميم البروتين الرشيد هي الحاجة لتوافر تركيب البروتين (أو على الأقل نموذج تماثل جيد بدرجةٍ كافية) والفهم الدقيق لآلية التحفيز. ومن التركيب، فإنه

يمكن تعريف بعض الأحماض الأمينية (النقاط الساخنة) والتي يعتقد أنها تشارك في الخصائص المطلوبة بواسطة تقنيات النمذجة الجزيئية. ويمكن عند ذلك تنفيذ الطفرات موجهة الموقع (SDM) في هذه المواضع باستخدام، على سبيل المثال طريقة الطفرة موجهة الموقع QuikChange™ من شركة ستراتاجين. وقد كان التصميم الرشيد للبروتين ناجحاً بصفةٍ خاصة حيث تم تناول خصائص مثل تغيير النشاط أو انتقائية المتشابهات، ويمكن العثور على أمثلة عديدة في المراجع [٥].

(٢ , ٢ , ٤) التطور الموجه Directed Evolution

التطور الموجه (أيضاً يسمى التطور في المختبر أو التطور الجزيئي) هو تقنية لتغيير البروتين واختيار الفرد الأنسب. وظهرت هذه التقنية خلال عقدٍ من الزمان بوصفها أداة قوية للغاية وواسعة النطاق لتحسين المحفزات الحيوية. وبشكلٍ عام، تشمل إستراتيجية التطور الموجه التطفير العشوائي متبوعاً بفحص عالي الإنتاجية (HTS) و/ أو خطوة اختيار (الشكل رقم ١ , ٤).

تبدأ العملية مع اختيار الإنزيم المعروف، والذي يجب توافره في صورة معدلة وله نظام تعبير مناسب في متناول اليد، ثم تعريف الخاصية التي تحتاج إلى تحسين. ويتم إعداد مكتبة كبيرة من الطفرات، غير منحازة قدر الإمكان، من خلال التطفير العشوائي للجينات المرمزة للبروتين، وفقاً للتقنيات المفصلة لاحقاً. بعد الاستنساخ والتعبير، يتم إنشاء مجموعة ضخمة من متغيرات الإنزيم، عادةً في حدود 10^{4}–10^{6} متغير. وفي النهاية تتعرض هذه المكتبة إلى تعريف الطفرات ذات الخاصية المتطورة المطلوبة باستخدام أساليب الفحص أو الاختيار. ولاحقاً يمكن أن تستخدم أفضل طفرة ناجحة بصفتها نقطة انطلاق محسنة للجولات الإضافية من التطفير من أجل تراكم الطفرات المفيدة. وفي كثيرٍ من الأحيان يمكن أن تستخدم المعلومات المستمدة من تحليل الطفرات كأساس لمناهج التصميم الرشيد للبروتين.

في الأجزاء التالية، سوف يتم تقديم أهم أساليب التطفير ونظم الفحص عالي الإنتاجية، متبوعةً بأمثلة على التطبيق الناجح لتجارب التطور الموجه في إنتاج المحفزات الحيوية المحسنة.

(١ , ٢ , ٢ , ٤) طرق التطفير Mutagenesis Methods

يمكن اتباع إستراتيجيتين مختلفتين لإنشاء مكتبات الطفرات: (١) التطور اللاجنسي (غير المعدل)، وفيه يخضع الجين الأصلي للتطفير العشوائي لإنتاج متغيرات ذات طفرات نقطية، و(٢) التطور الجنسي (المعدل)، وفيه يتم تجزئة عدة جينات أصلية بشكلٍ عشوائي ثم يعاد تعديلها لإنتاج مجموعة من مكتبات الطفرات (Chimeras).

في السنوات الـ ١٥ الماضية، تم تطوير عدد كبير من الطرق وسيتم وصف بعضها بإيجاز في الفقرات التالية. ويتوفر الكثير من المراجع والكتب للاستعراض الأعمق والأكثر تفصيلاً [٦-١٠].

الطريقة اللاجنسية الأكثر استخداماً هي تفاعل تسلسل البلمرة عرضي الخطأ (epPCR). وهنا تستخدم ظروف تفاعل غير مثالية لإنشاء مكتبة طفرات [١١، ١٢]. على سبيل المثال، يمكن لزيادة المغنيسيوم+٢، وإضافة المنغنيز+٢، واستخدام تركيزات الـ dNTP غير المتوازنة، أن تزيد من معدل خطأ الـ *Taq*، إنزيم البلمرة من الثيرموس أكواتيكوس الذي يستخدم عادةً، من ٠,٠٠١ ٪ إلى ١٪. ومع ذلك، فلا يمكن إنشاء طيف طفرات متجانس (مكتبة غير منحازة) باستخدام إنزيم بلمرة دنا الـ *Taq* مع المنجنيز٢+ والنيوكليوتيدات غير المتوازنة؛ لأن "إنزيم البلمرة أو تحيز الخطأ" سوف يؤدي إلى وجود اتجاه لتبادل الـديسوكسي نيوكليوتيدات A أو T أفضل من G أو C. وحالياً تتواجد إنزيمات بلمرة الدنا محسنة تظهر طيف طفرات أكثر تجانساً تجارياً، على سبيل المثال Mutazyme™ I و II من شركة ستراتاجين مع معدل خطأ عالٍ، وكذلك *Taq*-Pol I614K [١٣] أو *Pfu*-Pol (exo-) D473G [١٤]. وقد تم حل المشكلة الأخرى والناتجة من التحام منتج طفرة الـ epPCR إلى ناقل الاستنساخ أو التعبير جزئياً عن طريق تقنية "الجالب" التي طورها بيشيت وزملاؤه [١٥]. ويمكن اعتبار هذه الطريقة كتعديل لطريقة QuikChange™ لشركة ستراتاجين؛ لأنها تستند على تضخيم البلازميد كله تحت ظروف التطفير. وفي تقنية الـ MEGAWHOP المرتبطة، والتي يستخدم فيها الجين المطفر كبادئ فعال في تفاعل تسلسل البلمرة الثاني؛ لم تعد هناك حاجة للهضم الحصري والالتحام [١٦، ١٧]. ومؤخراً، تم دمج epPCR مع تضخيم الدائرة المتداولة (RCA) [١٨]، والذي يستخدم إنزيم بلمرة من فيروس البكتيريا φ في تضخيم متساوي الحرارة [١٩].

والمشكلة الأخرى الكبيرة في epPCR هي ما يسمى بـ "تحيز الشفرة" الناجم من شفرة التحلل الوراثية، والذي يعني أن تغيير حمض أميني معين سوف يكون أقل شيوعاً بكثير من غيره. على سبيل المثال، تؤدي طفرة واحدة في شفرة الفالين فقط إلى ستة بدائل أحماض أمينية بديلة. وهكذا، فإن ترميز جميع الأحماض الأمينية العشرين المشفرة للبروتين يتطلب تبادل الثلاث شفرات المجاورة، وهو حدث غير مرجح للغاية عند تعريض جين كامل مرمز للبروتين (أي ١٠٠٠ زوج قاعدة) إلى الـ epPCR بمعدل خطأ ١٪ [٨].

ويشمل البديل الأسهل لخلق الطفرات العشوائية استخدام السلالات المطفرة. تكون السلالات مثل إيبيكوريان القولون XL1-Red ناقصة في ثلاثةٍ من مسارات إصلاح الدنا الابتدائية (*mut*D (التدخل في نشاط إنزيم ٣'٥'-إكسونيوكليز)، *mut*S (الإصلاح غير المتطابق)، و *mut*T (عدم تحليل الـ 8-oxodGTP)) وتظهر معدل طفرات أكثر بـ ٥٠٠٠ مرة من سلالة العائل الأصلية. من الناحية الأولى، يتم مع هذا النهج تجنب خطوة الالتحام، ولكن من الناحية الأخرى، فإنه ليس هناك سيطرة على موقع الطفرة، والتي يمكن أن تؤثر في البادئ الموجود في

البلازميد، وعدد نسخه، وخصائص الناقل الأخرى. وهناك عدة مراجع تصف خلق الطفرات باستخدام هذه التقنية [٢٠-٢٣].

عند البدء من متغيرات الجينات المختارة مسبقاً ذات التماثل الكافي، فإنه يتم تفضيل طرق التعديل الجنسي؛ لأنها قد تجمع بين أفضل سمات كلٍ من المانحين الأصليين. وقد تم تطوير المثال الأول بواسطة ستيمنر وزملاؤه [٢٤] وسمي بخلط الدنا أو الجينات. وهو يتضمن خطوة تحليل تعتمد على إنزيم محلل للدنا والتعديل اللاحق للأجزاء بدون أي بادئ (تفاعل تسلسل بلمرة ذاتي البدء)، متبوعاً بتفاعل تسلسل بلمرة نهائي مع بادئ. وقد تم صقل هذه الطريقة في العقد الماضي، وتسمى أيضاً بخلط عائلة الدنا أو التهذيب الجزيئي. وأحد الطرق البديلة هو عملية التوسيع التعاقبي (StEP) التي طورها تشاو وزملاؤه [٢٥]. وهي تتكون من تضخيم الأجزاء القصيرة للجينات الأصلية، بحيث إنه في الدورات اللاحقة، يمكن أن يتم تهجين الأجزاء الصغيرة الناتجة على أيٍ من الجينات الأصلية. وعليه، يمكن تجنب التحيز الناتج من الهضم باستخدام الإنزيم الهاضم I للدنا. وقد تم تطوير المزيد من تحسين منهج الخلط الكلاسيكي بواسطة كوكو وزملاؤه، الذين ابتكروا طريقة بديلة لخلط الدنا تدعي تكوين الطفرات الناتجة عشوائياً في قوالب وقتية (RACHITT) اعتماداً على الترتيب، والتهذيب، وضم أجزاء الجين الأصلي أحادي الخيط المفصولة عشوائياً المهجنة في قالب وقتي أحادي الخيط كامل الطول. وقد أظهرت هذه الطريقة معدلات تعديل عالية و١٠٠٪ مركبات طفرات [٢٦]. ومن الواضح أن تشابه تسلسل الجينات الأصلية يكون شرطاً ضرورياً مقيداً لتطبيق تقنيات التعديل. ومع ذلك، فقد تم إدخال منهجيات لتعديل عدة تسلسلات أصلية دون الحاجة إلى تسلسل تماثل عالي، والذي يكون ضرورياً لتعديل الجينات ذات التركيب المعقد ولكن مع تناظر التسلسل المنخفض، مثل مونوأوكسيجينز P450 على سبيل المثال. وقد تم تطوير طريقة التماثل المستقلة الأولى بواسطة أوستماير وزملاؤه [٢٧، ٢٨]. وتعتمد طريقة الـ ITCHY (الاقتطاع التدريجي لإنشاء الإنزيمات المهجنة) على التحام أجزاء مـختلفة الحجم من اثنين من الجينات، والتي تم إنتاجها بواسطة إنزيم إكسونيوكلييز III وإنزيم الهضم نيوكلييز S1. والعيب الرئيس هو أنه توجد نقطة تعديل واحدة فقط. ومرةً أخرى فقد تم تحسين الطريقة وتم تطوير عدة طرق مستنتجة منها، على سبيل المثال الـ thio-ITCHY [٢٨، ٢٩]، وطريقة إعادة تجميع الجينات [٣٠]، والتعديل العشوائي غير التماثلي (NRR) [٣١، ٣٢]، وتعديل البروتين غير المعتمد على تماثل التسلسل (SHIPREC) [٣٣].

وقد تم تطوير إستراتيجية مختلفة تماماً لتطوير الإنزيمات دون إدخال الطفرات، وهي التطفير الأولي المستدير (CP) الذي اقترح من قبل لوتز وزملاؤه [٣٤]. وقد ربطوا نهايات النيتروجين والكربون للجين الأصلي الذي يرمز لإنزيم الليبيز ب من الكانديدا أنتاركتيكا، ومن ثم تخطيطه بواسطة الهضم العشوائي لإنتاج متغيرات تحمل نهايات نيتروجين وكربون بديلة. ومن المدهش، أن هذا لم يؤدِ فقط إلى إنزيم ليبيز نشط، ولكن أظهرت بعض المتغيرات

أيضاً كفاءة تحفيزية أعلى من السلالة الأصلية (حتى ١١ ضعف ضد البارا-نيتروفينول بيوتيرات، و١٧٥ ضعفاً ضد ٨،٦-داي فلورو-٤-ميثيل أمبيلليفيريل أوكتانوات، في حين ظلت قيم الـ K_m ثابتة تقريباً). وقد أوضحت التجارب الحركية لأنشط المتغيرات (cp283) أن التطفير الأولي المستدير لهذا الإنزيم لا تقوم بمعالجة انتقائية المتشابهات عند تحليل بعض الكحولات الثانوية الفراغية [٣٥].

وكما تم توضيحه سابقاً، فإنه تتوافر مجموعة واسعة من التقنيات لتطفير الجينات عشوائياً. ومن أجل التنبؤ ومقارنة نوعية مكتبة الطفرات، فقد تم تطوير عدة أدوات برمجيات لتسهيل تجارب تخطيط التطور الموجه. وغالباً ما تستخدم النسبة بين التحولات وتغيير الموقع في تقييم المكتبة، وقد أظهر وونج وزملاؤه باستخدام برنامج مساعد للتطفير (MAP) (والمتاح في الموقع http://map.iu-bremen.de)، أن هذا غالباً ما يفشل كتقدير [٣٦]. وقد اقترح المؤلفون بدلاً من ذلك مؤشر تركيب البروتين، ومؤشر الحمض الأميني (يستكمل بمعامل تنوع الشفرات)، ومؤشر التنوع الكيميائي بوصفها مؤشرات أفضل لمقارنات المكتبات.

وكما تم استعراضه مؤخراً [٣٧، ٣٨]، فقد تم ذكر عدة أدوات حاسوبية لمحاكاة عمليات التطفير ولبحث النتائج التجريبية المنشورة. والـ PEDEL (برنامج لتقدير التنوع في مكتبات الـ epPCR) والـ LDP (برنامج تنوع المكتبات) هما من أمثلة النماذج الحاسوبية المستخدمة لمحاكاة طرق التطفير العشوائية، وخاصةً الـ epPCR [٣٨]. وهناك برنامج آخر مفيد وهو الـ GLUE (برنامج للمكتبات التي تضم عينات عشوائية أو متغيرات محتملة بنفس الدرجة)، والذي تم تطويره لتقدير عدد المتغيرات التي تحتويها المكتبة وكيفية إيجاد مكتبة كبيرة من أجل أخذ عينات من جميع المتغيرات [٣٩]. وتتوافر برامج الـ GLUE وكذلك الـ PEDEL والـ DRIVeR في الموقع http://guinevere.otago.ac.nz/stats.html [٣٩، ٤٠]. وقد قام موري ومارانس بنمذجة طريقة الخلط وعليه قاموا بتطوير برامج الـ eShuffle والـ eSCRATCHY [٤١-٤٤] (http://maranas.che.psu.edu/software.html)، وكذلك طريقة الـ SIRCH لتوصيف اندماج المجموعات الطرفية الكامل المتفق مع تركيب بروتين معين [٤٥]. وقد طور وونج وزملاؤه دليل (مخطط إستراتيجية التطفير العشوائي (RaMuS) الذي ينبغي أن يساعد الباحثين، وخاصةً المبتدئين في مجال التطور الموجه، لاختيار طريقة تطفير عشوائية مناسبة معدلة حسب احتياجاتهم ومهاراتهم [١٠].

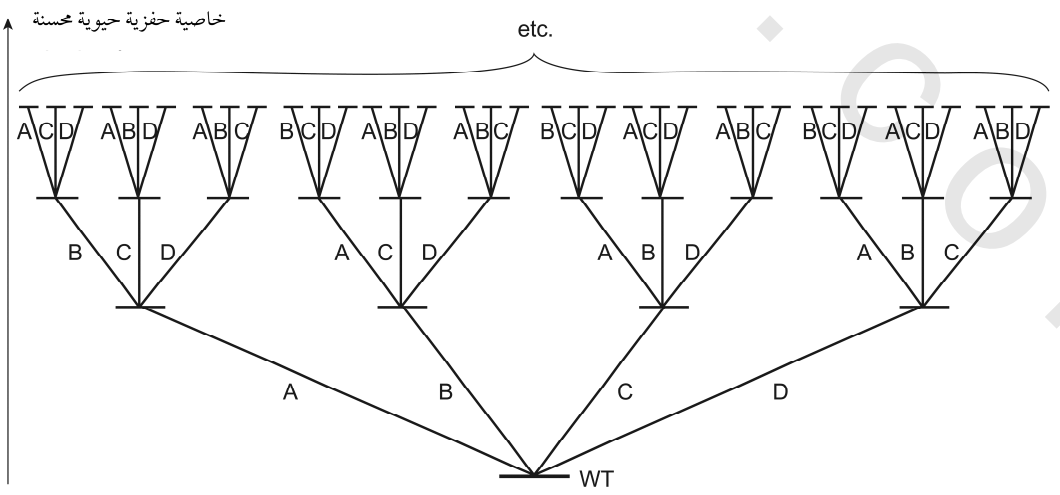
(٣, ٢, ٤) التطور موجه المركز Focused Directed Evolution

كثيراً ما تم نقاش مسألة ما إذا كان التصميم الرشيد أو التطور الموجه هو الإستراتيجية الأفضل ولم يمكن استخلاص أي استنتاج بسيط. في الواقع، تتم إعاقة التصميم الرشيد بواسطة تعقيد البروتينات وتحديده بمعرفتنا الضئيلة لارتباط التسلسل والوظيفة. أيضاً، فإنه في كثيرٍ من الأحيان لا يوفر النتيجة المطلوبة ويعطي في بعض

الأحيان متغيرات مدهشة جداً، والتي يمكن أن تكون بعيدة جداً عن الخاصية المطلوبة. على سبيل المثال، من الصعب التنبؤ بالثبات الحراري بالطريقة الرشيدة، وعليه يكون التطور الموجه هو الخيار الأفضل [٤٦].

في الآونة الأخيرة، تم اقتراح تركيبات من التطور الموجه والتصميم الرشيد، والتي سميت بالتصميم شبه الرشيد أو التطور الرشيد، على الرغم من أننا نفضل المصطلح التطور الموجه المركز. وقد تم ذكر التطبيق الناجح للتطفير التشبعي التكراري (ISM) بواسطة ريتز وزملاؤه. ويؤدي هذا إلى زيادة الثبات الحراري لإنزيم الليبيز (من النوع B-FIT) [٤٧، ٤٨]، وزيادة انتقائية المتشابهات، وتوسع القبول لأوساط التفاعل، مثل إنزيم الإيبوكسيد هيدروليز (من النوع CASTing) [٤٧-٤٩]. في طريقة الـ ISM يتم تحليل تركيب البروتين (أو نموذج التماثل) أولاً لتحديد مواضع جميع الأحماض الأمينية التي تسهم في خاصية معينة. بعد ذلك، يتم تعريض جميع المواقع (بشكلٍ منفصل) للتطفير التشبعي، متبوعاً بفحص المكتبات للخاصية موضع الاهتمام. ثم يتم استخدام أفضل نتيجة من كل مكتبة كقالب للجولات الأخرى من التطفير التشبعي، وتستمر هذه الإستراتيجية بطريقة تكرارية حتى إيجاد المحفز الحيوي المطلوب (الشكل رقم ٢, ٤).

ويتبع الـ CASTing (اختبار تشبع الموضع النشط الاندماجي) كنوع من التطفير التشبعي التكراري هذه الإستراتيجية لتحديد النقاط الساخنة، وخاصةً بالنسبة للخصائص مثل انتقائية المتشابهات أو تخصصية وسط التفاعل. وتستخدم هنا المساحة حول الموضع النشط في دائرة نصف قطرها حوالي ١٠ أنجستروم لتحديد جميع مجموعات الأحماض الأمينية الطرفية التي تتفاعل مع وسط التفاعل. وقد تم تطوير برنامج (CASTER) للتصميم المنهجي والفحص لمكتبات المتغيرات المركزة في جميع أنحاء جيب الارتباط. وهذ البرنامج متوفر على شبكة الإنترنت (http://www.kofo.mpg.de/kofo/institut/arbeitsbereiche/reetz/deutsch/reetz_forschung1.html).



الشكل رقم (٢, ٤). مبدأ التطفير التشبعي التكراري.

وقد استخدم الباحثون في شركة كوديكسيس نهجاً مماثلاً، وخلافاً لبرنامج CASTing، فإن إستراتيجيتهم لا تعتمد على التركيب ثلاثي الأبعاد أو نموذج التماثل، وقد حققوا تحسناً كبيراً في وظيفة التحفيز. والـ ProSAR هو امتداد للـ SAR (علاقة التركيب بالوظيفة)؛ وذلك لتعظيم البروتين الجزيئي، وعليه يتم تحليل العلاقة بين تركيب الجزيء المتفاعل (الإنزيم) والخاصية المطلوبة القابلة للقياس ووضعها في معادلة [٥٠]. وقد تم تحليل طفرات المكتبات من طرق التطفير المختلفة عن طريق النشاط والتسلسل، ومن ثم ترتيبها كـ"مفيدة"، و"يحتمل أن تكون مفيدة"، و"محايدة"، أو "مؤذية". ويتم استبعاد طفرات الفئة الأخيرة، وتبقى الطفرات المفيدة وتستخدم كإنزيمات أصلية للجولة التالية من الطفرات. وتتم إعادة اختبار الطفرات الأخرى وقد تستخدم أيضاً كأصول. ويعد تحسين إنزيم الهالوهيدرين ديهالوجينيز، المهم لإنتاج مرادف لعقار الأتورفاستاتين المخفض للكوليسترول، هو مثال ممتاز لفائدة هذه الطريقة (انظر القسم ٣, ٤, ٤).

ومن المحاولات شبه الرشيدة ذات تعديل طرق التطفير يوجد الـ SISDC (التطفير الفراغي موجه الموقع غير المعتمد على التسلسل) [٥١] والـ SCOPE (هندسة البروتين الاندماجية المعتمدة على التركيب) [٥٢] حيث يتم تحديد مواضع عبور اعتماداً على التركيب ثلاثي الأبعاد للبروتينات.

(٤, ٣) نظم الفحص Assay Systems

إن مفتاح نجاح تجربة التطور الموجه هو نظام فحص سريع وموثوق به للغاية. ونظراً لوجود عدد كبير من المتغيرات الممكنة التي تم إنشاؤها بطريقة التطفير العشوائي، فإنه يكون من الصعب تحديد النتائج المطلوبة بعد التعبير الفردي للمتغيرات باستخدام طرق التحليل الكلاسيكية، مثل الفصل الغازي اللوني أو الفصل اللوني السائل ذي الضغط المرتفع. وبناءً على ذلك، فإنه يجب توافر أدوات مناسبة عالية الإنتاجية لتحديد المحفزات الحيوية المطلوبة. ويمكن تقسيم الإستراتيجيات إما إلى أساليب الاختيار وإما إلى الفحص، على النحو المبين بالتفصيل لاحقاً. وكلاً من النهجين لديه مزايا وعيوب، ويجب اتخاذ قرار بشأن الأسلوب الأكثر ملاءمة على أساس كل حالة منفصلة. ويمكن الاطلاع على نظرة عامة واسعة للأدوات التي وصفت مؤخراً في كتاب ريمون [٥٣] وفي عدد من المراجع [٥٤-٥٨].

(١, ٣, ٤) الاختيار Selection

تعتمد الاختيارات الحيوية على تكامل خاصية الأوكسوتروف (عدم القدرة على إنتاج مركب عضوي معين) أو مقاومة العوامل السامة للخلية مثل المضادات الحيوية. وعند تطبيقه، فإن الاختيار يكون أداة قوية جداً

لفحص المكتبات الكبيرة واكتشاف طفرات البروتين. ومع ذلك، يقتصر استخدام اختيار الطرز المظهري على عزل محفزات التفاعلات ذات الصلة الحيوية المباشرة أو التي يمكن ربطها بصورةٍ غير مباشرة لاختيار طرز ظاهري. ويمكن أن تتم هذه الاختيارات في المختبر أو داخل الخلايا وإما في طور صلب أو الأطباق دقيقة المستوى. وتنشئ تقنيات التطفير مكتبات تتراوح عادةً بين 10^{5}–10^{10} فرداً. ومن أجل فحص كمية كبيرة من حيز التسلسل، فإنه يمكن استبعاد الأفراد غير النشطة أو غير المطلوبة للحد من حجم المكتبة.

(١, ١, ٣, ٤) تقنيات الاظهار Display Techniques

إن الاظهار بالفيروس البكتيري (الفاج) هو واحدة من التقنيات الأكثر شيوعاً لاختيار الطفرات الأنسب من مكتبة كبيرة في المختبر. وهي تتكون من استنساخ الجين المطلوب (في هذه الحالة كل فرد في مكتبة الطفرات) في انصهار مع جين يرمز لغطاء بروتيني لجزيئات الفيروس. وعندما يتم تجميع الفاج، يتم اظهار البروتين الأجنبي على سطحه. ولذلك، يتم تحقيق ارتباط مادي بين الجين وناتج التعبير عن طريق جسيمات الفاج. ويتم بعد ذلك أسر الفيروسات البكتيرية بواسطة التفاعل الانجذابي للإنزيم الظاهر مع رابط مقيد. وتعتمد طبيعة هذا الرابط على الإنزيم، على سبيل المثال، يمكن أن يكون إنزيم تاج الانصهار وسط تفاعل، أو وسط تفاعل انتحاري مدمجاً مع البيوتين (والذي يتم أسره لاحقاً على كريات الاستربتافيدين)، أو مشابه لحالة التقييد الانتقالية. ويتم إذابة الفيروسات المختارة، ونسخها، وتضخيمها بواسطة العدوى البسيطة [٥٩].

وقد وضح دانييلسن وزملاؤه اختيار الفيروسات المظهرة للـ Lipolase® (ليبيز) مع مثبط بيوتينيل مفسفر الذي مكن من إثراء المكتبة بـ ١٨٠ ضعف في دورة واحدة [٦٠].

ويمكن أيضاً اظهار مكتبات البروتين على البكتيريا والخميرة وكذلك على سطح الفيروس البكتيري. وللإظهار البكتيري مزايا معينة على الاظهار الفيروسي واسع الانتشار. أولاً، هناك حاجة لعائل مضيف واحد لنشر المكتبة مقارنةً مع اثنين في الاظهار الفيروسي، الفيروس البكتيري والبكتيريا. ثانياً، يمكن تضخيم المتغيرات المختارة مباشرةً دون نقل المزيد من المادة الوراثية إلى عائل مضيف آخر. ثالثاً، يمكن أن يكون خطر الانجذاب الاصطناعي بسبب آثار الشره أقل وضوحاً. وتم تحقيق الإظهار البكتيري لإنزيم الإستيريز من البوركولديريا جلاديولي بواسطة شولزايس وزملاؤه باستخدام جين اصطناعي يتكون من جين الإستيريز والمجالات الأساسية ذاتية النقل في إيشيريشيا القولون. وقد تم توجيه نشاط الإستيريز بنجاح إلى جزء الغشاء الخارجي كما تم إثباته بواسطة تقنيات مختلفة [٦١].

وقد تم أيضاً تكييف اظهار سطح الخلية البكتيرية إلى جانب الفحص الخلوي لفحص مكتبات الإنزيمات [٦٢]. في الواقع، فإن هذه التقنية تمثل حالياً النهج العام الوحيد للفحص الكمي للنشاط التحفيزي للإنزيمات على

مستوى الخلية الواحدة وفي مجموعات كبيرة جداً من الطفرات. وعلاوةً على ذلك، يوفر اظهار الإنزيمات على سطح البكتيريا حرية وصول وسائط التفاعل التخليقية إلى الإنزيم.

وقد ثبت أن القدرة على تشكيل ارتباط مادي بين منتج تفاعل مستشع والخلية التي تعبر الإنزيم المقابل على سطحها هي المفتاح للتحديد الكمي للنشاط التحفيزي على مستوى الخلية الواحدة. وحالياً تتوفر عدة طرق لإظهار الإنزيمات على سطح الخلية الميكروبية، وقد تم تطوير معظمها لإيشيريشيا القولون [٦٣].

وأحد الأمثلة هو استخدام الـ EstA، إنزيم استيريز من البوسودوموناس إيروجينوزا مرتبط بالغشاء الخارجي. وتم استخدام متغير EstA غير نشط كحافز ارتباط لإظهار سطح خلية إيشيريشيا القولون للإنزيمات المحللة للدهون. وقد أظهر تحليل التدفق الخلوي وقياس نشاط الليبيز أن جميع إنزيمات الليبيز من الباسيلس ساتليس، الفيوزاريوم سولاني بيسي، والسيراتشيا مارسيسينس قد تم تصديرها بكفاءة بواسطة الناقل الذاتي EsaA، وأنها تحتفظ أيضاً بنشاطها المحلل للدهون عند تعريضها لسطح الخلية [٦٤]. ومؤخراً جداً، وضح كولمار وزملاؤه أن بكتيريا إيشيريشيا القولون التي تظهر الإيستيريزات أو الليبيزات على سطح الخلية معاً مع بيروكسيديز الفجل (HRP) تكون قادرة على تحليل أسترات الحمض الكربوكسيلي للبيوتين تيرامايد. وبقيت شقوق التيرامايد التي نتجت من تفاعل الليبزز المقترن بالبيروكسيديز لفترة قصيرة وعليه ارتبطت تساهمياً بمجموعات التيروزين النشطة التي كانت تقع بالقرب من سطح الخلية البكتيرية التي تظهر نشاط الليبيز. وقد وجد أن اختلافات نشاط الاستيريز الخلوي تتطابق جيداً مع كمية البيوتين تيرامايد المتراكمة على سطح الخلية. وقد أتاح هذا التعليم الانتقائي بالبيوتين تيرامايد للخلايا ذات نشاط الليبيز عزلها عن طريق فرز الخلايا المغناطيسي [٦٥].

(٤,٣,١,٢) الاختيار داخل الخلايا *In Vivo* Selection

يمكن القيام بالاختيار داخل الخلايا عندما يكون النشاط المستهدف ضرورياً للحيوية والنمو، على سبيل المثال، التغلب على زيادة تركيزات المضادات الحيوية أو توفير مادة غذائية أساسية [٦٦].

وقد تم توضيح المبدأ بواسطة ريتز وروجيبيرج عن طريق مثال والذي اقترن فيه البقاء على قيد الحياة بتحليل متشابه معين والذي يحرر مركب مثبط للنمو [٦٧]. وهكذا، لا تستطيع الكائنات الدقيقة التي تعبر متغير إنزيم الليبيز ذو انتقائية المتشابهات المناسبة شق هذا المركب، ولذلك تبقى على قيد الحياة، محفزةً للتخصيب الفعال للمزرعة بمتغير الإنزيم ذي انتقائية المتشابهات المطلوبة.

وفي بعض الأحيان يتم إجراء الاختيار كنهج تكاملي: ويتم فقط إنتاج متغير إنزيم مطفر (أي ناتج أيض أساسي) [٦٨، ٦٩].

وقد عرضت مجموعة ستيمار أربع جينات للسيفالوسبورينيزات من أنواع الإنتيروباكتر، واليرسينيا، والسيتروباكتر، والكليبسيلا إلى الـ epPCR أو خلط الدنا. وقد تم فحص مكتبات من أربع أجيال (أي ما مجموعه ٥٠٠٠٠ مستعمرة) عن طريق الاختيار على أطباق الآجار مع تركيز متزايد من الموكسالاكتام (مضاد حيوي من البيتا-لاكتام). وقد أمكن فقط للمستنسخات القادرة على تحليل المضاد الحيوي البيتا-لاكتام أن تبقى على قيد الحياة. وأظهرت أفضل متغيرات من الـ epPCR زيادة نشاط تقدر بثمانية أضعاف، ولكن أظهرت أفضل طفرة من خلط الجينات المتعدد مقاومة للموكسالاكتام أعلى بـ ٢٧٠-٥٤٠ ضعف [٧٠].

بالنسبة للمكتبات المعبرة في الكائنات الدقيقة، يمكن إجراء الـ HTS على المستعمرات التي تنمو في مزرعة صلبة مثل طبق الآجار. وعادةً تمكن طرق فحص المستعمرات على أطباق أجار من فحص أكثر من ١٠٤ متغيرات في غضون أيام، لكنها غالباً ما تكون محدودة في الحساسية: تنتشر المنتجات القابلة للذوبان بعيداً عن المستعمرة، وعليه يتم الكشف عن المتغيرات النشطة للغاية فقط. وطرق الفحص القائمة على المنتجات غير القابلة للذوبان تكون عادةً ذات حساسية أعلى، ولكن يكون نطاقها محدوداً إلى حدٍ ما.

ويعتمد فحص المرحلة الصلبة على إذابة المنتج بعد التفاعل الإنزيمي الذي يعطي منطقة رائقة، أو منتج مستشع، أو تغير في الرقم الهيدروجيني يتم ملاحظته بواسطة مؤشر الرقم الهيدروجيني أو منتج قوي الامتصاص (مولد لوني) مثل الإكس-جال أو ألفا-نافثيل أسيتات والأزرق السريع/الأحمر السريع كمثال لتعيين نشاط إنزيم الاستيريز [٧١، ٧٢].

وقد تكشف طريقة الفحص عن منتج الإنزيم مباشرةً أو يمكن دمجها لإنزيمٍ ثانٍ والذي يمكن رصد منتجه بدوره بسهولة، كما هو موضح بالدمج الناجح للسيتوكروم P450 مع بيروكسيديز الفجل [٧٣]. وإذا كانت طريقة الفحص سامة أو تتطلب تحلل الخلايا، فإنه يتم نقل جزء من الخلايا من مستعمرة إلى غشاء مرشح، حيث يتم الفحص [٧٤]. في الأعوام الأخيرة، تم توظيف التصوير الرقمي بشكلٍ متزايد لتحقيق إنتاجية أعلى وتقييم كمي للإشارة أعلى [٧٣، ٧٥، ٧٦].

لا يزال من الممكن فحص النشاط المحلل للدهون بصورةٍ عالية الإنتاجية على الأطباق، باستخدام ثلاثي الأولين وثلاثي البوتيرين-أجار من خلال تشكيل هالة. وبدلاً من ذلك، فقد تم مؤخراً تطوير طريقة فحص عالية الإنتاجية في المرحلة الصلبة بواسطة بابياك وريمون عن طريق استخدام استرات الكومارين [٧٧].

(٢, ٣, ٤) الفحص Screening

لا يمكن تطبيق الكثير من طرق الفحص في صورة المرحلة الصلبة. ولذلك يجب زراعة المستنسخات الفردية وفحصها في الأطباق دقيقة المستوى. وتستهلك طرق الفحص هذه المزيد من الوقت بصورةٍ أكبر من طرق

فحص المرحلة الصلبة. ومع ذلك، فإنه يمكن زيادة الإنتاجية بصورةٍ ملحوظة عن طريق استخدام الروبوت الآلي وتقنية اختيار المستعمرة. والميزة الرئيسة هي أن طرق الفحص توفر المعلومات بصورةٍ كبيرة أكثر من طرق الاختيار حيث يمكن قياس النشاط بصورةٍ مباشرة وكمية، وتسمح حتى بتعيين الحركية. وعلاوةً على ذلك، تمكن طرق الفحص من التحديد المباشر لانتقائية المتشابهات لإنزيم، والتي تكون في كثيرٍ من الأحيان الخاصية الرئيسة التي تحتاج إلى تحسين للمحفزات الحيوية الصناعية.

(١, ٢, ٣, ٤) طرق الفحص بالهيدروليز Hydrolase Assays

يمكن تعيين نشاط تحليل الاسترات باستخدام مجموعة واسعة متنوعة من أوساط التفاعل، وبصورةٍ تفضيلية باستخدام المركبات "الحقيقية" المهمة مقارنةً مع البدائل (أوساط التفاعل غير الطبيعية المصممة لتوفير إشارة مكثفة قابلة للكشف عند تحويلها بواسطة إنزيم). ومع ذلك، فلا يمكن إجراء كل طرق فحص النشاط في صورةٍ عالية الإنتاجية اللازمة لفحص المكتبات الكبيرة الناتجة من بروتوكولات التطفير المستخدمة في التطور الموجه. ومثال بسيط هو طريقة فحص حالة الرقم الهيدروجيني باستخدام مستحلبات ثلاثي البوتيرين أو ثلاثي الأولين كأوساط تفاعل. وطرق الفحص اللونية والطيفية هي بلا شك الطرق الأكثر انتشاراً لتحديد الأنشطة التحليلية. وهي تنطوي على انقسام إستر لتنتج مولد لوني/ طيفي يتم قياسه. والمولدات اللونية/ الطيفية الأكثر استخداماً هي البارا-نيتروفينول، والفلوريسين، والريزورفين، أو الكومارين. والعيوب الرئيسة لاستخدام أوساط التفاعل الاصطناعية هذه هي أنها تختلف عن أوساط التفاعل الحقيقية، وعليه يمكن أن تؤدي إلى نتائج إيجابية كاذبة، وأنها غالباً ما تكون غير متوفرة تجارياً.

وتعتمد إحدى طرق الفحص، والتي يمكن فيها استخدام الخلات مباشرةً كوسط تفاعل "حقيقي" على "اختبار حمض خليك" متاح تجارياً (شركة آر-بيوفارم المحدودة، دارمشتات، ألمانيا). ويدمج هذا الاختبار تحليل الخلات مع تتابع إنزيمي يعتمد على الخلات يؤدي إلى تشكيل الـ NADH المتكافئ [٧٨]. وعند استخدام متشابهات الخلات النقية ذات التركيب الفراغي أر، و إس في تجارب منفصلة ولكن باستخدام نفس متغير الإنزيم، فإن الطريقة تسمح بتعيين انتقائية المتشابهات. وعليه يمكن استخدام هذه الطريقة بنجاح لتعريف متغير للإستيريز ذو انتقائية متشابهات عالية في تخليق (إس)-بيوتين-٢-أول [٧٩].

وأحد العيوب المهمة في طرق فحص النشاط التحليلي لإنزيمات الليبيزات والاستيريزات هو أن معظم أوساط التفاعل تكون شحيحة الذوبان في البيئات المائية ومخاطر التحلل الذاتي القوي في درجة الحموضة الشديدة أو الحرارة المرتفعة باستخدام أوساط التفاعل مولدة اللون أو الطيف.

للتحايل على هذه المشكلة، تم وصف إستراتيجيتين في المراجع. أولاً، تم استبدال استرات البارا-نيتروفينل أو الكومارين بإيثرات الأسيلوكسي ميثيلين المقابلة أو الداي أسيل جليسرول المناظر. وهذا يجعل أوساط التفاعل أكثر استقراراً، حيث يتم فصل الاستر المعرض للفصل الإنزيمي من مولد اللون (أو الطيف)، متجنباً التحلل الذاتي حيث إن شاردة الكحول الآن تعدُّ مجموعة صعبة المغادرة مقارنة مع أيون الكومارين أو البارا-نيتروفينوكسيد. واعتماداً على تركيبه الخاص، فإن الكحول المنفصل ينزع منه مجموعة كربوكسيل مباشرةً أو يتأكسد أولاً مع البرأيودات ثم يتعرض إلى نزع البيتا المحفز بالـ BSA من أجل تحرير مولد اللون/ الطيف [٨٠-٨٢]. ويتم تطبيق هذه الطريقة أيضاً على فحص وتوصيف الإنزيمات ذات انتقائية المتشابهات [٨٣]. وتكمن العيوب في الحاجة لتخليق أوساط التفاعل المصممة خصوصاً وأنه يمكن فقط إجراء القياسات عند نقطة النهاية بدلاً من التعيين الكمي لحركيات الإنزيم. ويستخدم تعديل للطريقة الموضحة سابقاً المعايرة العكسية مع الإيبينفرين لبرأيودات الصوديوم التي تستهلك في أكسدة الديول الناتج عن الفصل الإنزيمي [٨٤-٨٥].

وفي عام ١٩٩٧م، وصف جينس وكازلاوسكاس أول طريقة HTS لانتقائية المتشابهات استناداً إلى التحليل المنفصل لمتشابهات أسترات البارا-نيتروفينيل لحمض فراغي، المسماة بـ Quick E. وقد عينوا في هذه الطريقة انتقائية المتشابهات E عن طريق قياس معدلات التحليل الأولية للمتشابه النقي من ٤-نيتروفينيل-٢-فينيل بروبانوات ومركب مرجعي (الريزورفين تتراديكانوات). والمزايا هي وقت القياس القصير، والحاجة لكمية أصغر بكثير من الهيدروليز، وسهولة قياس انتقائية المتشابهات العالية. وأيضاً هناك بعض العيوب مثل الحاجة لمتشابهات نقية، والحاجة لمحلول رائق، وأنه يمكن فقط استخدام الاختبار لأوساط التفاعل مولدة اللون [٨٦]. وقد تم تطبيق طريقة الـ Quick E بنجاح في اختبار انتقائية وسط التفاعل في سلسلة الهيدروليزات [٨٧-٨٩].

من أجل استخدام راسيمات كوسط تفاعل، فإن هناك حاجة لتقنية فصل قبل تعيين كل متشابه. ويمكن أن يكون هذا الفصل وفقاً للفراغية أو يكون وفقاً للكتلة الجزيئية في أوساط التفاعل المعلمة بالنظائر المشعة. وقد تم تكييف الفصل اللوني السائل ذي الضغط العالي والفصل اللوني لتكون طرق عالية الإنتاجية من أجل استخدامهما [٩٠]. وبهذه الخطوة، تم إجراء نحو ٧٠٠ قياس يومياً لفحص مكتبة طفرات من ليبيز البوسودوموناس إيروجينوزا لانتقائية المتشابهات في أسترة ٢-فينيل بروبانول. ويستخدم قياس طيف الكتلة (MS) مع مركب واحد معلم بالنظائر المشعة في زوج متشابهات في تحليلات الحركية (راسيمات زائفة) [٩١] أو في التحويل الحيوي لمركب غير نشط ضوئياً (meso-compound). وقد تم أيضاً تكييف الكهربية الشعرية الموازية التي تستخدم محددات فراغية (على سبيل المثال، السيكلوديكسترينات) كطور ثابت زائف في المحلول الكهربائي لمعالجة ما يصل إلى ٩٦ عينة في الوقت نفسه، مما يسمح بتعيين ٧٠٠٠ عينة من الأمينات المشتقة فراغياً في اليوم [٩٢].

(٤,٣,٢,٢) طرق الفحص بالأوكسيدوريداكتيز Oxidoreductase Assays

تتبع معظم طرق فحص الأوكسيدوريداكتيز تكوين أو نضوب الـ NAD(P)H عن طريق قياس الامتصاص عند ٣٤٠ نانومتر. وعلى الرغم من أن تركيز العامل المساعد يرتبط مباشرةً بتحول وسط التفاعل، فإنه يجب توخي الحذر، حيث يمكن أن تتأثر النتائج بواسطة تفاعلات الخلفية التي تحدث في المتحللات الخام للخلايا، مما يجعل تنقية الإنزيم المطلوب في كثيرٍ من الأحيان ضرورية.

الديهيدروجينيزات عادةً يقاس نشاط الديهيدروجينيزات بواسطة تتابع من التفاعلات لدمج إنتاج الـ NAD(P)H مع تكوين مركبات ملونة. ومن الأمثلة على ذلك صبغات الترازوليوم مثل نيترو بلو ترازوليوم (NBT). وقد تم وصف طريقة فحص الـ NBT/ فينازين ميثوسلفات (PMS) للكشف عن نشاط الديهيدروجينيز [٩٣]. وقد تبين أن طريقة الفحص تعمل في الطور السائل والصلب والأكثر أهميةً من ذلك أنه يمكن تطبيقها على الـ HTS [٩٤]. وتستخدم طريقة أخرى الصورة المختزلة من العامل المساعد. وفي ما يسمى "بطريقة فحص القلوية" يتحلل الـ $NAD(P)^+$ تحت ظروف قلوية قوية لتكوين منتج عالي الاستشعاع [٩٥].

ويمكن تتبع النشاط المؤكسد عن طريق دمج الإنتاج الإنزيمي لفوق أكسيد الهيدروجين بتفاعل بيروكسيديز الفجل (HRP). ويتفاعل إنزيم الـ HRP، على سبيل المثال، في وجود فوق أكسيد الهيدروجين مع مركبات مثل الـ ABTS وينتج منتج أخضر قابل للذوبان والذي يمكن تعيينه طيفياً عند ٤٠٥ نانومتر [٩٦]. ويمكن استخدام أوساط تفاعل أخرى مولدة اللون، مثل الأورثو-دايانيزيدين، كبدائل للـ ABTS [٩٧].

وفي مثالٍ حديث، تم فحص مكتبات التطور الموجه من الأسبرجلس نيجر التي تعبر إنزيم الجلوكوز أوكسيديز لتحسين الثبات لدرجة الحموضة والحرارة. ومن أجل ذلك فقد طور شفانيبيرج وزملاؤه طريقة فحص بالأطباق دقيقة المستوى ذات ٩٦ حفرة متوسطة الإنتاجية، والتي تظهر فيها أكسدة الجلوكوز بواسطة الفيروسينيميثانول المؤكسد تغيراً في اللون من الأزرق إلى الأصفر الشاحب، والذي يمكن تسجيله عند ٦٢٥ نانومتر [٩٨].

ويمكن أيضاً استخدام الـ ABTS والأورثو-دايانيزيدين مباشرةً لقياس نشاط البيروكسيديز. وقد تم وصف إثبات تطبيق الـ HTS من مكتبات الإنزيمات في عددٍ من الأمثلة [٩٩-١٠٢]. ويمثل فحص الجواياكول طريقة فحص أخرى لتعيين نشاط البيروكسيديز، الذي تم استخدامه لفحص إنزيم البيروكسيديز محسن السيتوكروم ج [١٠٣]. يتأكسد الجواياكول (٢-ميثوكسي فينول) عديم اللون إلى شق الفينوكسي في وجود البيروكسيديز. ويتبلمر الشق إلى التترا جواياكول البني، ويمكن الكشف عنه عند ٤٧٠ نانومتر.

وقد تم نشر عدة طرق فحص لنشاط الأوكسيجينيز، مثل أحادي أوكسيجينيز الهيم P450. على سبيل المثال استخدمت طريقة فحص نظير البارا-نيتروفينوكسي (p-NA) في مجموعة من تجارب التطور الموجه [١٠٤-١٠٦].

وقد نشر شفانيبيرج وزملاؤه مؤخراً نظام فحص يعتمد على المنتج باستخدام العامل مولد اللون بارا-نيترو ثيوفينولات (pNTP) في التطور الموجه لإنزيم الإيبوكسجينيز كمثال أحادي لأوكسيجينيز P450 BM3. والـ pNTP هو مولد لون أصفر يتفاعل مع إيبوكسيد من خلال هجوم محب للنواة، مما يؤدي إلـى فتح الحلقة ومنتج عديم اللون [١٠٧].

(٤,٣,٢,٣) طرق الفحص بالهيدروكسي نيتريل ليز Hydroxynitrile Lyase Assays

تحفز إنزيمات الهيدروكسي نيتريل ليزات (HNL) انشقاق السيانوهيدرينات وعادةً يتم تعيين النشاط بواسطة انشقاق الـ HCN من الماندیلونیتریل المحفز بواسطة الإنزيم. ويمكن بعد ذلك تعيين البنزالديهايد الناتج طيفياً عند ٢٨٠ نانومتر. وعلى الرغم من أن طريقة الفحص هذه يمكن تطبيقها بإنتاجية عالية، إلا أنها تقتصر على أوساط التفاعل الأروماتية أو العطرية. والخيار الآخر للكشف عن النشاط هو تحويل البنزالديهايد بواسطة إنزيم الكحول ديهيدروجينيز وتعيين تركيز الـ NADH المتزايد [١٠٨]. وبديلاً عن ذلك، يمكن تعيين الـ HCN المتحرر كما وصف من قبل سيلمار وزملاؤه [١٠٩]، على أساس التفاعل الذي وصفه كونيج [١١٠]، والتي يمكن اعتباره طريقة فحص لجميع الأغراض دون التقيد بأي وسط تفاعل معين. في هذه الطريقة يتأكسد الـ CN^- أولاً بواسطة الكلوروسكسينيميد، ثم يرتبط بالبيريدين، وبعد حدوث التحليل إلى ألدهيدات الجلوتاكونيك. وأخيراً في تفاعل كونيج، يتكون مركب ملون يمكن الكشف عنه عند ٥٨٠ نانومتر في وجود أمين أولي وحمض الباربيتيوريك ككاشف اقتران. وقد تم تطوير هذه الطريقة مؤخراً لقياسات النشاط في الأطباق دقيقة المستوى للنظم عالية الإنتاجية [١١١]. وتعدُّ الطريقة مفيدة نظرياً للكشف عن النشاط وانتقائية المتشابهات للـ HNLs تجاه أي وسط تفاعل سيانوهدريني.

قد تحدث قيود في حالة أوساط التفاعل الكارهة للماء؛ بسبب أنها شحيحة الذوبان في الماء. ويمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق استخدام عوامل الاستحلاب مثل الصمغ العربي. وكما ثبت، فإن زيادة العكارة ليس لها تأثير على التكوين والتعيين الطيفي للصبغة. والعيب الرئيس الآخر هو أنه حتى الآن يمكن فقط استخدام طريقة الفحص للتعيين عند نقطة النهاية وليس لقياسات الحركية. ولهذا الغرض ما زالت هناك حاجة لاستخدام تحويل الماندیلونیتریل كما ذكر أعلاه.

ويستند مبدأ طريقة فحص أخرى على طريقة فايجل أنجر [١١٢]، والتي تنتج لوناً أزرقاً عندما يلامس غاز الـ HCN ورق الترشيح المشبع بخليط إيثيل أسيتوأسيتات النحاس (٢) وقاعدة رباعية [١١٣]. والملح الأزرق هو منتج أكسدة للقاعدة الرباعية، والتي تتكون في وجود حمض الهيدروسيانيك وإيثيل أسيتوأسيتات النحاس (٢). وقد تم إجراء طريقة الفحص نفسها كتجميع ساندويتش، والذي يتم فيه فصل المستعمرات الملوثة للغشاء التي

يتم تحضينها في محلول وسط التفاعل في القاع، من ورق اختبار فايجل أنجر في القمة بواسطة نسيج نايلون نفاذ. ويسمح هذا التجميع حصرياً بوصول غاز الـ HCN إلى ورق الكشف ويؤدي إلى بقعة زرقاء داكنة مميزة مباشرةً فوق المستعمرة المنتجة للـ HNL.

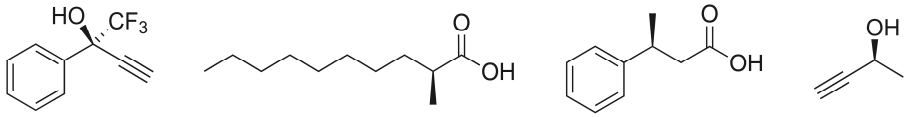
(٤ , ٤) أمثلة Examples

(١ , ٤ , ٤) الاستيريزات، والليبيزات، والفوسفوليبيزات Esterases, Lipases and Phospholipases

إن غالبية الإنزيمات المستخدمة صناعياً هي هيدروليزات (٦٥٪) وعليه يمكن الاطلاع على الكثير من الأمثلة للهيدروليزات المطورة في المراجع. وواحد من أول الأمثلة كان متغير لإنزيم الإستيريز من الباسيلاس ساتليس (BsubpNBE) ذي نشاط أكبر من السلالة الأصلية بـ ١٥٠ ضعف في ١٥٪ ثنائي ميثيل الفورماميد (DMF)، والناتج من جمع الـ epPCR والخلط. ويمكن تطبيق الإنزيم في نزع حماية المضاد الحيوي اللوراكاربيف في وجود الـ DMF كمذيب ثانوي [١١٤]. كما تم أيضاً زيادة الثبات الحراري لنفس الإنزيم بـ ١٤ درجة مئوية في ثمانية جولات من الـ epPCR والتعديل [١١٥].

وقد تم تطوير إستيريز مماثل، BS2، والذي يختلف فقط بـ ١١ حمض أميني عن الـ BsubpNBE، بواسطة التصميم الرشيد في مجموعتنا وأمكن زيادة انتقائية المتشابهات تجاه الكحول الرباعي خلات ٢-فينيل-٣-بيوتين-٢-يل بستة أضعاف إلى E = ١٩، وتجاه خلات اللينالیل المحولة من تفضيل الصورة آر إلى الصورة إس بدرجة E = ٦ [١١٦]. وفي دراسةٍ لاحقة، أظهرت هذه الطفرة (G105A) انتقائية متشابهات جيدة تجاه خلات ٢-فينيل-٣-بيوتين-٢-يل (E =٥٤) في ٢٠٪ DMSO (حجم/ حجم)، وقيمة E> ١٠٠ تجاه نظير الترايفلورو ميثيل [١١٧] (الشكل رقم ٣, ٤). وأعطت طفرة أخرى، E188D، انتقائية متشابهات مماثلة عالية تجاه كلٍ من وسطي التفاعل فضلاً عن سلسلة من خلات الكحولات الثلاثية الأخرى [١١٨].

وقد تمكنا أيضاً باستخدام نهج مركز عشوائي من عكس انتقائية المتشابهات [١١٩]. وتم خلال الفحص بطريقة خلات المذكورة سابقاً تعريف طفرة مزدوجة (E188W/M193C) ذات تفضيل للصورة إس وقيمة E حوالي ٧٠ تجاه ١،١،١-ثلاثي فلورو-٢-فينيلبيوت-١-اين-٣-أول. ومن الجدير بالذكر أن الطفرات الفردية E188W أو M193C التي يمكن أيضاً الحصول عليها بواسطة التطفير العشوائي، تظهر فقط E =١٦ لمتشابه الصورة إس أو انتقائية منخفضة للصورة أر، على التوالي، وأن الجمع فقط، والذي لم يكن من المرجح الحصول عليه بالتطفير العشوائي "الطبيعي"، هو الذي أدى إلى العكس الجوهري لانتقائية المتشابهات. وعليه فإن هذه النتيجة التآزرية هي حجة ممتازة لاستخدام التطور الموجه المركز (الشكل رقم ٣, ٤).



[117-119] [120-122] [123, 127] [79]

الشكل رقم (٣, ٤). أمثلة مختارة للمركبات الفراغية الناتجة من استخدام الاستيريزات أو اللليبيزات المصممة.

وبوقتٍ قصير بعد ذكر الاستيريز المطور الأول من قبل مجموعة أرنولد، تم ذكر التطور الموجه لإنزيم ليبيز من البسودوموناس إيروجينوزا من قبل ريتز وزملاؤه. وكانت انتقائية المتشابهات الأولية في التحليل الحركي لإستر البارا-نيتروفينيل لحمض ٢-ميثيل-ديكانويك (MDA) E =١,١ (مع تفضيل حمض الصورة إس)، وبعد أربع جولات من الـ epPCR تم الحصول على E =١١. وقد تم إنتاج المزيد من الطفرات عن طريق الجمع بين الطفرات في المواضع التي تم تعريفها على أنها حرجة لإنتاج أفضل المتغيرات في كل جولة، مما أدى إلى تعريف متغير أكثر انتقائية للمتشابهات E =٢١ [١٢٠]. وللتفاعل نفسه، أثبت نهج خلط الدنا أنه فعال، منتجاً متغيراً أظهر E =٣٢. وعلاوةً على ذلك، تم تطبيق نسخة معدلة من التطفير الاندماجي متعدد الشرائط لستيمار على اثنتين من الطفرات الناتجة والشريط الأحادي التطفيري، والذي سمح بالعشوائية في الوقت نفسه المناطق المحددة سابقاً كـ "نقاط ساخنة". وقد أدى هذا إلى المتغير الأكثر في انتقائية المتشابهات (إكس، ذو ستة طفرات)، مظهراً عامل انتقائية ذو E =٥١. وبالإضافة إلى ذلك، أمكن أيضاً تعريف متغيرات ذات انتقائية جيدة للصورة أر (E =٣٠) [١٢١]. ومن المثير للاهتمام، أنه تقع طفرة واحدة فقط إلى جانب الموقع النشط، في حين أن جميع الاستبدالات الأخرى تكون بعيدة. وبعد دراسةٍ نظرية، تم تحضير ١٠ متغيرات جديدة وأعطت الطفرة المزدوجة M8 (S53P/L162G) التي كان من المفترض أن تظهر انتقائية متشابهات عالية قيمة E =٦٤ عند تحويل يقدر بـ٢٠٪ [١٢٢] (الشكل رقم ٣, ٤).

وقد تم أيضاً ذكر المحاولات لتحليل المخاليط الراسمية لإسترات الكحولات الثانوية باستخدام طفرات الاستيريز من البسودوموناس فلوريسينس (PFE-I). وقد استخدمت مجموعتنا السلالة المطفرة إيشيريشيا القولون XL-1 أحمر، لتطوير تفضيل متشابهات في تحليل ميثيل-٣-فينيل بيوتيرات [١٢٣]. وقد تم أيضاً تطوير نفس الإنزيم بواسطة الـ epPCR وطريقة فحص الخلات لتطبيقه في التحليل الانتقائي للمتشابهات لوحدة البناء المهمة جداً (إس)-٣-بيوتاين-٢-أول مع زيادة تماثل (زت) >٩٩٪ [٧٩]. وهنا كانت دورة واحدة فقط من الـ epPCR لازمة للحصول على متغير يحتوي على طفرات ثلاثية النقطة والتي أظهرت انتقائية متشابهات أعلى بدون التحليل الزائد. وفي وقتٍ لاحق، تم دراسة تأثير كل طفرة على انتقائية المتشابهات، ومعدل التفاعل، وذوبان الطفرة. وكان الاستنتاج النهائي من هذا العمل أن الطفرات القريبة من الموقع النشط يمكن أيضاً أن يكون لها تأثير كبير (سلبي) على طي البروتين، والذي ينبغي أن يتلقى المزيد من الاهتمام في مجال هندسة البروتين.

obeikandl.com

يعد الليبيز ب من الكانديدا أنتاركتيكا (CAL-B) أحد أكثر المحفزات الحيوية استخداماً في الكيمياء العضوية [١٢٤]. ومع ذلك، لم يكن من الممكن الحصول على مزيدٍ من المتغيرات الثابتة حرارياً بالتطفير الرشيد. وعند استخدام منهج التطور الموجه، تم الحصول على متغيرات بعد جولتين من التطفير بالـ epPCR، والتي كانت أكثر ثباتاً بـ ٢٠ ضعف عند ٧٠ درجة مئوية من السلالة الأصلية. وقد وجد أن الموضعين ٢٢١ و٢٨١ كانا حاسمين لمنع التثبيط غير العكسي وتجميع البروتين لهذه المتغيرات المحسنة، والتي ثبت أيضاً أنها أكثر نشاطاً ضد البارا-نيتروفينيل بيوتيرات والـ ٨،٦-داي فلورو-٤-ميثيل أمبيليفيرايل أوكتانوات [١٢٥].

وقد تم تصميم الـ CAL-B بواسطة خلط الجين الخاص به مع جينات الليبيز من جنس الهيفوزايما CBS 648.91 والكريتوكوكاس تسوكوباينسيس ATCC 24555 من أجل خلق متغير لإنزيم الليبيز ب ذو زيادة في نشاط تحليل الداي إيثيل-٣-(٣،٤'-داي كلوروفينيل) جلوتارات، والذي يعطي وحدة تخليق فراغية لتحضير لإعداد مقاوم NK1/NK2 مزدوج [١٢٦].

وقد تم تطوير انتقائية المتشابهات لإنزيم الليبيز من البوركولديريا سيباسيا KWI-56 تجاه انتقائية متشابه الصورة أر في تحليل إستر البارا-نيتروفينيل لحمض ٣-فينيل بيوتريك باستخدام تقنية جديدة لتركيب وفحص مكتبة البروتينات بواسطة تضخيم جزيء دنا واحد بواسطة تفاعل تسلسل البلمرة متبوعاً بنظام تعبير/ ترجمة مزدوج في المختبر. وقد تم إنشاء المكتبة عن طريق تشبع أربعة مواضع (إل١٧، إف١١٩، إل١٦٧، وإل٢٦٦)، ثم التخفيف حتى يوجد فقط خمسة جزيئات دنا لكل حفرة في طبق المستوى الدقيق. وقد تم تضخيم هذه الجزيئات باستخدام جزيء واحد ناتج من تفاعل تسلسل البلمرة وتعبيره في المختبر، حيث إن كل جزء من الجين يحمل بالفعل بادئ الـ T7، وموضع ارتباط الريبوسوم، ومنهي الـ T7. ويتم مرةً أخرى تخفيف الحمض النووي الدنا الموافق للحفر التي تظهر انتقائية المتشابهات المطلوبة ليعطي جزيء واحد لكل حفرة، ثم يعاد تضخيمه، ويعاد فحصه. وقد أظهر أفضل متغير عامل انتقائية E =٣٨ تجاه متشابه الصورة أر، في حين أظهرت السلالة الأصلية E =٣٣ لمتشابه الصورة المضادة [١٢٧] (الشكل رقم ٣, ٤).

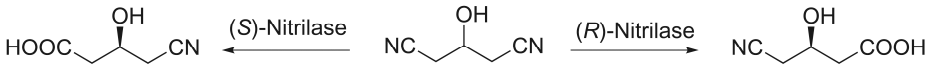
تم تحسين نشاط إنزيم الفسفوليبيز أ١ الموجود بالفعل في الكثير من الليبيزات كنشاط غير مميز بصورةٍ جوهرية في ليبيز الستافيلوكوكاس أورياس بواسطة جولات متعاقبة من الـ epPCR. بعد أربع جولات، تم الحصول على منتجين، يظهران زيادة تقدر بـ ٩, ٥ و٩, ٦ ضعف في نسبة نشاط الفسفوليبيز/ الليبيز. وقد تم إجراء جولة نهائية من خلط الدنا من إنزيم الليبيز لهذين المنتجين والسلالة الأصلية لدمج الطفرات المفيدة وللقضاء على الطفرات المحايدة أو الضارة. وقد أعطت هذه الطريقة متغيراً يحتوي على ستة طفرات في الأحماض الأمينية ويظهر زيادة تقدر بـ ٦, ١١ ضعف في نشاط الفسفوليبيز المطلق وزيادة تقدر بـ ٥, ١١ ضعف في نسبة الفسفوليبيز/ الليبيز مقارنةً مع نقطة البداية

[١٢٨]. وبطريقةٍ مماثلة، أسفرت جولة واحدة من الـ epPCR عن زيادة في نسبة الفسفوليبيز/ الليبيز تقدر بـ ١٧ ضعف لإنزيم الليبز المحب للحرارة والقلوية من الباسيلاس ثيرموكاتينولاتوس [١٢٩].

ويمكن تغيير انتقائية طول السلسلة لإنزيمات الليبيز عن طريق التطفير موجه الموقع، كما تم توضيحه بواسطة يورجار وهاس لإنزيم الليبيز من الريزوباس أورايزي (سابقاً ريزوباس ديليمار) [١٣٠]، ولكن أيضاً عن طريق التطور الموجه [٦٠]. خلال محاولة عزل متغيرات إنزيمية جديدة لإنزيم الليبيز المفرز خارج خلايا الثيرومومايسيس لانوجينوزا ذات نشاط محسن في وجود المنظفات، وقد قام دانييلسن وزملاؤه بتوزيع تسعة أحماض أمينية عشوائياً في منطقتين تربطان غطاء الألفا المرن. وقد وجدت طفرة S83T في ستةٍ من المتغيرات السبعة الأكثر نشاطاً، والتي ثبت أنها تغير تفضيل طول السلسلة في الريزوباس أورايزي المتماثل.

(٢, ٤, ٤) النيتريليز Nitrilase

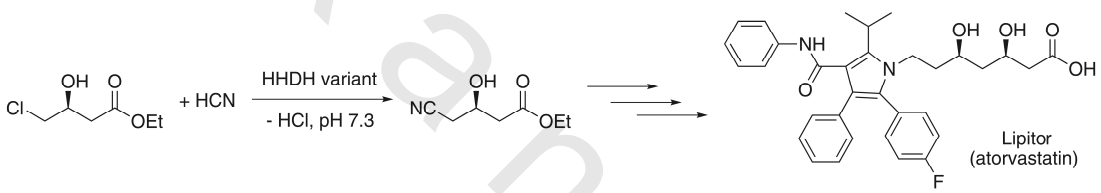
تم الحصول على إنزيم نيتريليز محسناً بصورةٍ كبيرة يمكن استخدامه في الإنتاج الصناعي لحمض (أر)-٤-سيانو-٣-هيدروكسي بيوتريك (الشكل رقم ٤, ٤)، وهو مركب وسيط مهم للأتورفاستاتين (الليبيتور)، بواسطة التصميم التطوري باستخدام طريقة التطفير التشبعي لموقع الجين (GSSM) التي تم تطويرها من قبل شركة ديفيرسا [١٣١]. في الـ GSSM يتم استبدال كل حمض أميني في البروتين مع واحد من الأحماض الأمينية الـ ١٩ المخلقة للبروتين [١٣٢، ١٣٣]. ويتم هذا على المستوى الجيني مع مجموعة بادئ تشمل إما ٣٢ أو ٦٤ متغيرات الشفرة لكل مجموعة حمض أميني طرفية للإنزيم الأصلي. وهكذا، تسمح الـ GSSM بالوصول غير المنحاز إلى كافة متغيرات الشفرة. ومع ذلك، قد لا تنطبق هذه الطريقة على معظم المختبرات الأكاديمية؛ بسبب تكلفتها العالية وعدم وجود معدات الفحص عالي الإنتاجية المتطورة. في هذا المثال، حفز النيتريليز الأصلي إلغاء أو نزع التناظر من الـ ٣-هيدروكسي جلوتارايل النيتريل مع منتج زيادة تماثل (زت) ٩٥٪ عند تركيز وسط تفاعل ١٠٠ ملي مولار. ولكن عند استخدام التركيز الأكثر ارتباطاً بالصناعة ٣ مولار، فقد لوحظ وجود فائض متشابه غير مرضٍ يقدر بـ ٨٧,٦٪ زيادة تماثل. لذا فقد تم إنشاء مكتبة تصل إلى كل متغير حمض أميني واحد للإنزيم الأصلي ذي ٣٣٠ حمض أميني مع عدد متغيرات نظري يقدر بـ ١٠٥٢٨، وتم فحصها مع زيادة أخذ عينات ثلاث مرات في طريقة فحص عالية الإنتاج اعتماداً على قياس طيف الكتلة باستخدام مزيج من وسط التفاعل الفراغي الطبيعي والمعلم بنظائر النيتروجين المشعة. وقد أدى ذلك إلى تعريف متغير ذي طفرة واحدة (A109H) والذي أظهر انتقائية متشابهات ممتازة ومكن من إنتاجية حجمية تقدر بـ ٦١٩ جم/ لتر في اليوم الواحد. وكان هذا مستبعداً جداً باستخدام الـ epPCR أو تعديل الجينات؛ وذلك لأن طفرة الألانين إلى الهيستيدين تتطلب تبادل قاعدتين في ثلاثيات الشفرة.



الشكل رقم (٤, ٤). نزع التناظر من الـ ٣-هيدروكسي جلوتارونيتريل الفراغي باستخدام النيتريليزات المطورة.

(٤, ٤, ٣) الهالوهيدرين ديهالوجينيز Halohydrin Dehalogenase

تم تحسين الوظيفة الحفزية لإنزيم الهالوهيدرين ديهالوجينيز (HHDH) من الأجروباكتريوم راديباكتر بواسطة التطور المدفوع بالـ ProSAR، والذي أدخله فوكس وزملاؤه للحصول على إيثيل(أر)-٤-سيانو-٣-هيدروكسي بيوتيرات، والتي تشارك أيضاً في تخليق الأتورفاستاتين (ليبيتور) (الشكل رقم ٤, ٥) [٥٠]. وكان للإنزيم الجديد ٤٠٠٠ ضعف إنتاجية حجمية في الأسينة (إدخال مجموعة السيانيد) مقارنةً مع السلالة الأصلية. ويوضح هذا المثال أيضاً كفاءة الجمع بين الاعتبار النظري والطرق المعملية من أجل تحسين وظيفة المحفز الحيوي.



الشكل رقم (٤, ٥). تخليق مرادف رئيس لليبيتور باستخدام الهالوهيدرين ديهالوجينيز (HHDH). احتوت المتغيرة الأفضل على ٣٥ طفرة.

(٤, ٤, ٤) المونوأوكسيجينيز P450 Monooxygenase P450

السيتوكروم P450 مونوأوكسيجينيز هو إنزيم مهم جداً في الصناعة وقد أدت التقنيات الكثيرة التي تنطوي على تطفير الـ P450 BM-3 (من الباسيلاس ميجاتيريوم، بروتين انصهار طبيعي لإنزيم المونوأوكسيجينيز P450 وببتيدات الريداكتيز) إلى مجموعة متنوعة من المحفزات الحيوية ذات مميزات مهمة صناعياً (تطوير الأدوية، وعمليات التحلل الحيوي، والتحفيز الحيوي). فعلى سبيل المثال تم استخدام التطور الموجه من قبل وونج وزملاؤه لزيادة نشاط التحفيز للسيتوكروم P450 BM-3 في المذيبات العضوية الثانوية. وكان الإنزيم الأولي طفرة معزولة سابقاً، P450 BM-3 F87A، ذات نشاط مرتفع [١٠٥]. وتم الحصول على الطفرات باستخدام الـ epPCR متبوعاً بالتطفير التشبعي وتم فحص نشاطها التحفيزي في أطباق ذات ٩٦ حفرة مع وبدون المذيب العضوي الثانوي الداي ميثيل سلفوكسيد (DMSO) ورباعي هيدرو فيوران (THF). وأظهرت الطفرة F87A5F5، المعزولة في الجولة الثانية من التطفير العشوائي، زيادةً في النشاط النوعي (٥, ٥ ضعف في ١٠٪ DMSO؛ ١٠ أضعاف في ٢٪

THF). وأعطت الطفرة 5F5، حيث تم تطفير الألانين في الموضع ٨٧ عكسياً إلى الفينيل ألانين، ما يقرب من ستة أضعاف أعلى في النشاط النوعي في ٢٥٪ DMSO، ولكن فقط زيادة تقدر بـ ٣,٤ ضعف في ٢٪ THF. وقد تم أيضاً تعيين الأنشطة النوعية للطفرات في مذيبات ثانوية قابلة للامتزاج بالماء: الأسيتون، الأسيتونيتريل، داي ميثيل فورماميد (DMF)، والإيثانول. وفي جميع الحالات زاد النشاط وبصورةٍ قابلة للمقارنة بالتحسينات الملاحظة للـ DMSO والـ THF.

(٤,٤,٥) الألدوليزات Aldolases

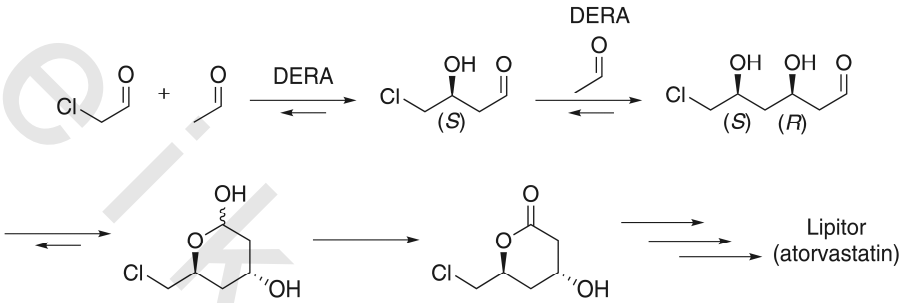
تم وصف مجموعة واسعة من الألدوليزات في المراجع، والتي تسمح بتكوين رابطة الكربون-الكربون بين ألدهيد وجزيء مانح (على سبيل المثال، داي هيدروكسي أسيتون فوسفات (DHAP)، والبيروفات، والفسفوإينول بيروفات، وما إلى ذلك) وعليه تخلق ما يصل إلى مركزين تجسيميين في خطوة تفاعل واحدة. وهذا يجعل هذه المحفزات الحيوية جذابة جداً للتخليق العضوي [١٣٤، ١٣٥]. ومع ذلك، فإن مجالات وسط التفاعل الضيقة وتثبيط الإنزيم في ظل ظروف التخليق تمثل العقبات الرئيسة لتطبيق الألدوليزات على المستوى الكبير.

ومرةً أخرى، يمكن التغلب على هذه القيود بواسطة التطور الموجه. وقد تم تطوير طريقة أنيقة جداً للتخليق المحفز بالألدوليز لمركب وسيط رئيس لليبيتور مبدئياً من قبل مجموعة وونج [١٣٦] والتي حفز فيها الـ DERA (٢-ديؤكسي-دي-ريبوز-٥-فوسفات ألدوليز) تفاعل تاندوم ألدول عالي انتقائية المتشابهات بين الكلوروأسيتالدهيد واثنين من مكافئات الأسيتالديهيد (الشكل رقم ٦,٤).

ومع ذلك، فإن الإنزيم يفتقر للاستقرار الكافي في وجود الأسيتالديهيد وتم تحسين التفاعل في تعاون مع شركة ديفيرسا [١٣٨] ومن قبل باحثين في الـ DSM. وقد قاموا بتعريف متغيرات أكثر استقراراً في مكتبات الطفرات بواسطة الفحص لأفضل استقرار وأحسن إنتاجية. وعند دمج أفضل المتغيرات، تم الوصول إلى تحسين يقدر بعشرة أضعاف تحت الظروف المهمة صناعياً [١٣٧]. وقد وصفت مجموعة وونج أيضاً طريقة اختيار داخل الخلية للتطور الموجه لإنزيم إل-رامنولوز ألدوليز بدءاً من إنزيم إل-رامنولوز-١-فوسفات ألدوليز (RhaD) [١٣٩]. وقد مكنت هذه الطريقة من تعريف متغير إنزيم الـ RhaD المطلوب من مكتبة مشتقة من الـ epPCR، والتي على النقيض من الإنزيم الأصلي قبلت الداي هيدروكسي أسيتون بدلاً من المناظر الـ DHAP المكلف للغاية وغير المستقر في فسفرته كمانح. أيضاً، أمكن تحسين ألدوليز الـ KDPG (دي-٢-كيتو-٣-ديؤكسي-٦-فوسفوجلوكونات) فيما يتعلق بنشاطه التحفيزي، وتخصصيته لوسط التفاعل، وانتقائيته التجسيمية عن طريق

التطور الموجه [١٤٠]. وقد تم تعريض إنزيم مرتبط يستخدم مشتقات الجالاكتوز (KDPGal) لمزيج من الـ epPCR، وخلط الدنا والتطفير موجه الموقع، مما أسفر عن متغير ذو كفاءة تحفيزية محسنة بـ ٦٠ ضعف في تخليق منتج مسار الشيكيمات [١٤١].

ويمكن العثور على مجموعة واسعة من الأمثلة الأخرى على الألدوليزات المحسنة بواسطة التطور الموجه في عددٍ من المراجع الحديثة [١٤٢-١٤٤].



الشكل رقم (٦, ٤). تخليق مرادف رئيس لليبيتور باستخدام ٢-ديؤكسي-دي-ريبوز-٥-فوسفات ألدوليز (DERA) في تفاعل تانوم ألدول مع الكلوروأسيتالدهيد واثنين من مكافئات الأسيتالديهيد كمواد بادئة [١٣٧].

(٥, ٤) الاستنتاجات Conclusions

لقد برزت هذه التقنية، فقط بعد بضع سنوات من ذكر التطور الموجه لأول مرة لهندسة البروتينات، باعتبارها أداة قوية جداً لتصميم وتعديل خصائص الإنزيمات. وسرعان ما وجدت هذه الطريقة تطبيقها في مجموعة واسعة من البروتينات، مع كون الغالبية العظمى مفيدة في التحفيز الحيوي. وبناءً على ذلك، فقد تم تطوير مجموعة متنوعة من أدوات البيولوجيا الجزيئية لخلق مكتبات طفرات متوازنة جداً وكذلك أساليب فحص عالية الإنتاجية مناسبة لجعل تطبيق التطور الموجه أسهل وأكثر جدوى. وفي غضون عقد من الزمن فقط، برز التطور الموجه كطريقة قياسية في هندسة البروتينات وعليه يمكن استخدامها تكميلياً أو مع تصميم البروتين الرشيد لتلبية الطلب على المحفزات الحيوية القابلة للتطبيق الصناعي والتي تظهر الانتقائية الكيميائية والفراغية والتجسيمية، فضلاً عن تحمل ظروف العملية (على سبيل المثال، تركيزات وسط التفاعل العالية، والمذيبات، ودرجات الحرارة، والثبات طويل المدى). وعلاوةً على ذلك، فقد وجدت هذه الطريقة بالفعل طريقها إلى مختلف التطبيقات الصناعية، كما تم ذكر أعلاه للأمثلة التفصيلية المختارة وكما هو ملخص في الجدول رقم (١, ٤).

الجدول رقم (١ , ٤). أمثلة مختارة من تحسن بالطرق البيولوجية الحفازة التطور الموجه.

الإنزيم (المصدر)	الهدف	طريقة التطفير	طريقة الفحص	الخاصية المحسنة	التطبيقات	المراجع
إستيريز من بسودوموناس فلوريسينس	إنتقائية المتشابهات ضد ٣-بيوتاين-٢-أول	EpPCR	فحص الخلات	زيادة إنتقائية المتشابهات	إنتاج (إس)-٣-بيوتاين-٢-أول مع >٩٩٪ زيادة تماثل (وحدة بناء فراغية)	[٧٩]
إستيريز من بسودوموناس فلوريسينس	إنتقائية المتشابهات ضد ميثيل-٣-بروومو-٢-ميثيل بروبيونات	التطفير العشوائي بالقرب من الموضع النشط	فحص الـ pNPA، QuickE	زيادة إنتقائية المتشابهات بـ ٥ أضعاف	إنتاج (MBMP) وحدة تخليق فراغية مهمة	[٨٩]
إستيريز من بسودوموناس فلوريسينس	تحسين الثبات	epPCR و StEP	الأطباق دقيقة المستوى مع المعالجة الحرارية	زيادة الثبات الحراري وانخفاض تثبيط وسط التفاعل	(إس)-كيتوبروفين	[١٤٥]
ليبيز من بسودوموناس إيروجينوزا	إنتقائية المتشابهات	epPCR، التطفير العشوائي، التطفير الشرائطي	الأطباق دقيقة المستوى مع إسترات البارا-نيتروفينيل	زيادة قيمة الـ E من ١ إلى ٦٤	-	[١٢٠-١٢٢]
إستيريز من باسيلاس سابتيليس	نشاط عالي في الـDMF تجاه استرات بارا-NB في للوراكاربيف	cpPCR، التطفير العشوائي، الخلط	الأطباق دقيقة المستوى مع إسترات البارا-نيتروفينيل	زيادة النشاط بـ ١٥٠ ضعف في ١٥٪ DMF، زيادة الثبات الحراري	التحفيز الحيوي الصناعي	[١١٤]
هيم بيروكسيديز من كوبرينوس سينيريوس	الثبات والنشاط تحت ظروف الغسيل	epPCR، التطفير العشوائي، الخلط	التحضين في الأطباق دقيقة المستوى عند درجة pH عالية مع فوق أكسيد الهيدروجين، قياس النشاط المتبقي	زيادة الثبات المؤكسد بـ ١٠٠ ضعف، زيادة الثبات الحراري بـ ١٧٠ ضعف	صناعة الغسيل	[١٠٠]
هيدانتوينيز من جنس الأرثروباكتر	إنتقائية المتشابهات المعكوسة	epPCR، التطفير العشوائي	مؤشر الـ pH	إنتقائية الصورة إل، ونشط بـ ٥ أضعاف	إنتاج الأحماض الأمينية في الصورة إل صناعياً	[١٤٦]
سابتيليسين	الثبات الحراري	epPCR، التطفير العشوائي	ببتيدة انبارا-نيتروأنيليد المخلقة (s-AAPF-pNA)	زيادة حتى ٦٠° درجة	صناعة الغسيل	[١٤٧]
سابتيليسينات من ٢٥- جنس باسيلاس (Savinase®)	النشاط، الثبات الحراري، تحمل المذيبات العضوية، تغيرات الـ pH	خلط العائلات	مناطق رائقة في آجار اللبن FRET (BODIPY-FL-كازين)	تحسين خصائص جميع العوامل	صناعة الغسيل	[١٤٨،١٤٩]
فيتيز من أسبرجيلاس فيوميجاتاس	تحسين النشاط في درجات الـ pH المنخفضة	التصميم الرشيد، التطفير موجه الموضع	بارا-نيتروفينيل فوسفات	انخفاض درجة الـ pH المثلى بحوالي ٥ , ٠-١ , ٠ وحدة	صناعة أعلاف الحيوانات	[١٥٠]

obeikandl.com

تابع الجدول رقم (١ , ٤).

الإنزيم (المصدر)	الهدف	طريقة التطفير	طريقة الفحص	الخاصية المحسنة	التطبيقات	المراجع
زيلانيز من ترايكوديرما ريسي	تحمل الحرارة، تغير درجات الـ pH المثلي	التصميم الرشيد، التطفير موجه الموضع	مناطق رائقة بيضاء في أطباق الآجار المحتوية على الزيلان مع الريازول بريليانت بلو	زيادة الثبات الحراري بـ ٤ إلى ٥ أضعاف عند ٦٠-٦٥° درجة	تبييض اللب	[١٥١]
بيتا-أميليز من فول الصويا	تغير درجات الـ pH المثلي	التصميم الرشيد، التطفير موجه الموضع		تغير الـ pH من ٤ , ٥ إلى ٦ , ٠-٦ , ٦	صناعة الأغذية	[١٥٢،١٥٣]
ألفا-أميليز من باسيلاس أميلوليكويفاشيانس	النشاط النوعي والنشاط في درجات الـ pH القلوية	التطفير موجه الموضع، epPCR، الخلط	طريقة فحص فادييماس المعدلة (فارماسيا)	تحسين النشاط عند pH ١٠	صناعة الغسيل	[١٥٤]
زيلوز أيزوميريز من ثيرموتوجه نيبوليتيكا	تحسين النشاط مع الجلوكوز في درجات الحرارة والـ pH المنخفضة	EpPCR	فحص الأطباق دقيقة المستوى باستخدام طريقة الريزورسينول-حديديك $(NH_4)_2SO_4/HCl$	خفض درجة الحرارة المثلى (٦٠° درجة)، وزيادة النشاط بـ ١٢ ضعف	التحفيز الحيوي الصناعي	[١٥٥]
P450 BM3	ادخال مجموعة هيدروكسيل للألكانات قصيرة السلسلة مثل الأوكتان	StEP، epPCR	الاختيار مع مناظر أوكتان، فحص استهلاك الـ NADH مع البروبان	التحسين بـ ١٠٠ ضعف للأوكتان، أسرع هيروكسيليز للألكان معروف حالياً	التحفيز الحيوي والتحلل الحيوي	[١٥٦]
P450 BM3	ادخال مجموعة هيدروكسيل بانتقائية فراغية وتجسيمية للألكانات الخطية	StEP، التطفير موجه الموقع، epPCR، الخلط	فحص استهلاك الـ NADPH مع البروبان	تحسين الانتقائية الفراغية والتجسيمية في تخليق أوكتانول (إس) و (أر)	التخليق غير المتناظر	[١٥٧]
P450 BM3	النشاط في المذيبات العضوية	epPCR، التطفير العشوائي	الأطباق دقيقة المستوى مع الـ pNCA والمذيبات الثانوية	زيادة بـ ٥ , ٥ ضعف في النشاط في الـ DMSO، ١٠ ضعف في الـ THF	التحفيز الحيوي المؤكسد	[١٠٥]
بايفينيل دايوكسيجينيز من باسيلاس سيباسيا/ بسودودوموناس بسودوألكاليجينز	تخصصية وسط التفاعل	الخلط / StEP	الفحص اللوني لأطباق الآجار باستخدام البايفينيل أو PCB	تحسين النشاط تجاه البايفينيلات عديدة الكلور، البنزين والتولوين	التحلل الحيوي للملوثات القوية	[١٥٨]
تولوين مونوأوكسيجينيز من باسيلاس سيباسيا	تحسين تحويل النفثالين وتحليل الملوثات المكلورة (TCE)	الخلط	الفحص اللوني للأطباق دقيقة المستوى بتكوين صبغة الديازو من أورثو-ديانيزيدين تترا أزوتايزد	تحويل أسرع بـ ٤ , ٦ ضعف/ زيادة ضعفين في تحلل الـ TCE	التحلل الحيوي للملوثات القوية	[١٥٩]

obeikandl.com

تابع الجدول رقم (١, ٤).

الإنزيم (المصدر)	الهدف	طريقة التطفير	طريقة الفحص	الخاصية المحسنة	التطبيقات	المراجع
هالوألكان ديهالوجينيز من جنس رودوكوكاس	تحسين تحليل الملوثات المكلورة (TCP)	الخلط، epPCR	مؤشر الـ pH	زيادة ٨ أضعاف في نزع الهالوجين من ثلاثي كلور البروبان (TCE)	تحليل الملوثات السامة والقوية	[١٦٠]
إن-كاربامويليز من أسبرجيلاس توميفاشيانس	الثبات الحراري والمؤكسد	الخلط	مؤشر الـ pH	زيادة الثبات الحراري والمؤكسد	إنتاج الأحماض الأمينية في الصورة دي صناعياً	[١٦١]
جلوتارايل أسيليز من جنس بسودوموناس	تخصصية وسط التفاعل	epPCR أوليجو المرتفع، الخلط	فحص النمو (الاختبار على الأديبيل سيرين)	زيادة ٣-١٠ أضعاف في نشاط الأديبيل أسيليز	إنتاج المضادات الحيوية شبه المخلقة	[١٦٢،١٦٣]
بنزويلفورمات ديكاربوكسيليز من بسودوموناس بوتيدا	تخصصية وسط التفاعل	EpPCR	مؤشر الـ pH	تحسين في زيادة التماثل من ٨٢ إلى ٩٣٪، نشاط كاربوليجيز جديد على البنزالدهيدات المستبدلة في الوضع أورثو	التخليق الحيوي للمرادفات الفراغية	[١٦٤]
فوسفوتراي إستيريز من بسودوموناس ديمينوتا وأسبرجيلاس راديوباكتر	تخصصية وسط التفاعل	epPCR، الخلط، التطفير موجه الموقع	الفحص اللوني لأطباق الآجار باستخدام نظير أورثو-كومافوس	تحسين النشاط تجاه الفوسفاتات العضوية	المعالجة الحيوية لمياه الصرف	[١٦٥]
نيتريليز	انتقائية المتشابهات/ الإنتاجية الحجمية	GSSM	تعيين طيف الكتلة للمنتجات المختلفة المعلمة بالنظائر المشعة	نشاط وانتقائية متشابهات أعلى في محلول وسط تفاعل ٣ مولار	تخليق مركب وسيط للليبيتور	[١٣١]
مونوأمين أوكسيديز من أسبرجيلاس نيجر (MAO-N)	النشاط وانتقائية المتشابهات	سلالة مطفرة من إيشيريشيا القولون XL1-Red	الفحص المزدوج مع بيروكسيديز الفجل	نشاط أعلى بـ ٤٧ ضعف، انتقائية أعلى بـ ٥,٨ ضعف	إلغاء راسمية ألفا-ميثيل بنزيل أمين والأمينات الحلقية الثانوية	[٢١،٢٢، ١٦٦،١٦٧]
هالوهيدرين ديهالوجينيز (HHDH) من أجروباكتريوم راديوباكتر	الإنتاجية الحجمية	التطوير المدفوع بـ ProSAR	اختبارات النشاط المختلفة	تحسين بـ ٤٠٠٠ ضعف	تخليق مركب وسيط للليبيتور	[٥٠]
إيبوكسيد هيدروليز من أجروباكتريوم راديوباكتر	انتقائية المتشابهات	epPCR، الخلط	فحص أطباق الآجار وفحص النشاط تجاه إيثر البارا-نيتروفينيل جليسيديل (pNPGE)	تحسين انتقائية متشابهات يصل لـ ١٣ ضعف ضد p-NPGE، وكذلك تجاه إيبي كلوروهيدرين و٢،١-إيبوكسي هيكسان	إنتاج مرادف فراغي للكيماويات الصيدلية والدقيقة	[١٦٨-١٧١]

obeikandl.com

المراجع References

[١] Schoemaker, H.E., Mink, D., and Wubbolts, M.G. (2003) Dispelling the myths–biocatalysis in industrial synthesis. *Science,* **299,** 1694–1697.

[٢] Liese, A., Seelbach, K., and Wandrey, C. (2006) *Industrial Biotransformations*, 2nd edn, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[٣] Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., and Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature,* **409,** 258–268.

[٤] Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Ke ß eler, M., Stürmer, R., and Zelinski, T. (2004) Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.,* **43,** 788–824.

[٥] Bornscheuer, U.T. and Pohl, M. (2001) Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.,* **5,** 137–143.

[٦] Kurtzmann, A.L., Govindarajan, S., Vahle, K., Jones, J.T., Heinrichs, V., and Patten, P.A. (2001) Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12,** 361–370.

[٧] Lutz, S. and Patrick, W.M. (2004) Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Curr. Opin. Biotechnol.,* **15,** 291–297.

[٨] Neylon, C. (2004) Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Res.,* **32,** 1448–1459.

[٩] Otten, L.G. and Quax, W.J. (2005) Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol. Eng.,* **22,** 1–9.

[١٠] Wong, T.S., Zhurina, D., and Schwaneberg, U. (2006) The diversity challenge in directed protein evolution. *Comb. Chem. High Throughput Screen.,* **9,** 271–288.

[١١] Cadwell, R.C. and Joyce, G.F. (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.*, **2,** 28–33.

[١٢] Leung, D.W., Chen, E., and Goeddel, D.V. (1989) A method for random mutagenesis of a defi ned DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique,* **1,** 11–15.

[١٣] Patel, P.H., Kawate, H., Adman, E., Ashbach, M., and Loeb, L.A. (2001) A single highly mutable catalytic site amino acid is critical for DNA polymerase fidelity. *J. Biol. Chem.*, **276,** 5044–5051.

[١٤] Biles, B.D. and Connolly, B.A. (2004) Low-fi delity *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase mutants useful in error-prone PCR. *Nucleic Acids Res.*, **32,** e176.

[١٥] Bichet, A., Bureik, M., Lenz, N., and Bernhardt, R. (2004) The "Bringer" strategy: a very fast and highly efficient method for construction of mutant libraries by error-prone polymerase chain reaction of ring-closed plasmids. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **117,** 115–122.

[١٦] Miyazaki, K. and Takenouchi, M. (2002) Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid. *BioTechniques*, **33,** 1033–1038.

[١٧] Miyazaki, K. (2003) Creating random mutagenesis libraries by megaprimer PCR of whole plasmid (MEGAWHOP), in *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*, vol. **231** (eds F.H. Arnold and G. Georgiou), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 23–28.

[١٨] Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L., and Lasken, R.S. (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.*, **11,** 1095–1099.

[١٩] Fujii, R., Kitaoka, M., and Hayashi, K. (2004) One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplifi cation. *Nucleic Acids Res.*, **32,** e145.

[٢٠] Turner, N.J. (2003) Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol.*, **21,** 474–478.

[٢١] Alexeeva, M., Enright, A., Dawson, M.J., Mahmoudian, M., and Turner, N.J. (2002) Deracemization of α-methylbenzylamine using an enzyme obtained by *in vitro* evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.,* **41,** 3177–3180.

[٢٢] Carr, R., Alexeeva, M., Enright, A., Dawson, M.J., Mahmoudian, M., and Turner, N.J. (2003) Directed evolution of an amine oxidase possessing both broad substrate specificity and high enantioselectivity. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42,** 4807–4810.

[٢٣] Bornscheuer, U.T., Enzelberger, M.M., Altenbuchner, J., and Meyer, H.H. (1998) Mutator strain *Epicurian coli* XL1-red generates variants. *Strategies,* **11,** 16–17.

[٢٤] Stemmer, W.P.C. (1994) Rapid evolution of a protein by *in vitro* DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.*, **370,** 389–391.
[٢٥] Zhao, H. (1998) Molecular evolution by staggered extrension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat. Biotechnol.*, **16,** 258–261.
[٢٦] Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Plenkos, P.T., Squires, C.H., and Monticello, D.J. (2001) DNA shuffling methods for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat. Biotechnol.*, **19,** 354–359.
[٢٧] Ostermeier, M., Shim, J.H., and Benkovic, S.J. (1999) A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat. Biotechnol.*, **17,** 1205–1209.
[٢٨] Lutz, S., Ostermeier, M., and Benkovic, S.J. (2001) Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha phosphothioate nucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **29,** e16.
[٢٩] Ostermeier, M., and Lutz, S. (2003) The creation of ITCHY hybrid protein libraries, in *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols* (eds F.H. Arnold and G. Georgiou), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 129–141.
[٣٠] Short, J.M. (2003) Synthetic ligation reassembly in directed evolution, US Patent 6605449.
[٣١] Bittker, J.A., Le, B.V., Liu, J.M., and Liu, D.R. (2004) Directed evolution of protein enzymes using nonhomologous random recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101,** 7011–7016.
[٣٢] Bittker, J.A., Le, B.V., and Liu, D.R. (2002) Nucleic acid evolution and minimization by nonhomologous random recombinantion. *Nat. Biotechnol.*, **20,** 1024–1029.
[٣٣] Udit, A.K., Silberg, J.J., and Sieber, V. (2003) Sequence homology-independent protein recombination, SHIPREC, in *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols* (eds F.H. Arnold and G. Georgiou), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 153–164.
[٣٤] Qian, Z. and Lutz, S. (2005) Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation . *J. Am. Chem. Soc.*, **127,** 13466–13467.
[٣٥] Qian, Z., Fields, C.J., and Lutz, S. (2007) Investigating the structural and functional consequences of circular permutation on lipase B from *Candida antarctica. ChemBioChem.* **8,** 1989–1996. doi: 10.1002/cbic.200700373.
[٣٦] Wong, T.S., Roccatano, D., Zacharias, M., and Schwaneberg, U. (2006) A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *J. Mol. Biol.*, **355,** 858–871.
[٣٧] Moore, G.L. and Maranas, C.D. (2004) Computational challenges in combinatorial library design for protein engineering. *AIChE J.*, **50,** 262–272.
[٣٨] Wong, T.S., Roccatano, D., and Schwaneberg, U. (2007) Steering directed protein evolution: Strategies to manage combinatorial complexity of mutant libraries. *Environ. Microbiol.*, **9,** 2645–2659.
[٣٩] Patrick, W.M., Firth, A.E., and Blackburn, J.M. (2003) User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein Eng. Des. Sel.*, **16,** 451–457.
[٤٠] Firth, A.E. and Patrick, W.M. (2005) Statistics of protein library construction . *Bioinformatics*, **21,** 3314–3315.
[٤١] Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L., Maranas, C.D., and Benkovic, S.J. (2001) Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98,** 11248–11253.
[٤٢] Moore, G.L. and Maranas, C.D. (2002) Predicting out-of-sequence reassembly in DNA shuffling. *J. Theor. Biol.*, **219,** 9–17.
[٤٣] Moore, G.L. and Maranas, C.D. (2000) Modeling DNA mutation and recombination for directed evolution experiments. *J. Theor. Biol.*, **205,** 483–503.
[٤٤] Moore, G.L., Maranas, C.D., Lutz, S., and Benkovic, S.J. (2001) Predicting crossover generation in DNA shuffling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98,** 3226–3231.
[٤٥] Moore, G.L. and Maranas, C.D. (2003) Identifying residue-residue clashes in protein hybrids by using a second-order mean-fi eld approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100,** 5091–5096.
[٤٦] Adamczak, M. and Krishna, S.H. (2004) Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.*, **42,** 251–264.
[٤٧] Reetz, M.T., Carballeira, J.D., and Vogel, A. (2006) Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45,** 7745–7751.
[٤٨] Reetz, M.T. and Carballeira, J.D. (2007) Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Biotechnol.*, **2,** 891–903.

[٤٩] Reetz, M.T., Wang, L.W., and Bocola, M. (2006) Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45,** 1236–1241, Erratum 2494.

[٥٠] Fox, R.J., Davis, S.C., Mundorff, E.C., Newman, L.M., Gavrilovic, V., Ma, S.K., Chung, L.M., Ching, C., Tam, S., Muley, S., Grate, J., Gruber, J., Whitman, J.C., Sheldon, R.A., and Huisman, G.W. (2007) Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nat. Biotechnol.*, **25,** 338–344.

[٥١] Hiraga, K. and Arnold, F.H. (2003) General method for sequence-independent site-directed chimeragenesis. *J. Mol. Biol.*, **330,** 287–296.

[٥٢] O' Maille, P.E., Bakhtina, M., and Tsai, M.D. (2000) Structure-based combinatorial protein engineering (SCOPE). *J. Mol. Biol.*, **321,** 677–691.

[٥٣] Reymond, J.L. (2005) *Enzyme Assays*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[٥٤] Bornscheuer, U.T. (2004) High-throughput-screening systems for hydrolases. *Eng. Life Sci.*, **4,** 539–542.

[٥٥] Schmidt, M. and Bornscheuer, U.T. (2005) High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomol. Eng.*, **22,** 51–56.

[٥٦] Wahler, D. and Reymond, J.L. (2001) High-throughput screening for biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12,** 535–544.

[٥٧] Wahler, D. and Reymond, J.L. (2001) Novel methods for biocatalyst screening. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **5,** 152–158.

[٥٨] Goddard, J.P. and Reymond, J.L. (2004) Recent advances in enzyme assays. *Trends Biotechnol.*, **22,** 363–370.

[٥٩] Soumillon, P. (2004) Selection of phage-displayed enzymes, in *Evolutionary Methods in Biotechnology. Clever Tricks for Directed Evolution* (ed. A. Schwienhorst), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 47–64.

[٦٠] Danielsen, S., Eklund, M., Deussen, H.J., Graslund, T., Nygren, P.A., and Borchert, T.V. (2001) *In vitro* selection of enzymatically active lipase variants from phage libraries using a mechanism-based inhibitor. *Gene*, **272,** 267–274.

[٦١] Schultheiss, E., Paar, C., Schwab, H., and Jose, J. (2002) Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli. J. Mol. Catal. B Enzym.*, **18,** 89–97.

[٦٢] Olsen, M.J., Stephens, D., Griffiths, D., Daugherty, P., Georgiou, G., and Iverson, B.L. (2000) Function-based isolation of novel enzymes from a large library. *Nat. Biotechnol.*, **18,** 1071–1074.

[٦٣] Becker, S., Schmoldt, H.U., Adams, T.M., Wilhelm, S., and Kolmar, H. (2004) Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15,** 323–329.

[٦٤] Becker, S., Theile, S., Heppeler, N., Michalczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., and Kolmar, H. (2005) A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett.*, **579,** 1177–1182.

[٦٥] Becker, S., Michalczyk, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., and Kolmar, H. (2007) Ultrahigh-throughput screening to identify *E. coli* cells expressing functionally active enzymes on their surface. *ChemBioChem*, **8,** 943–949.

[٦٦] Lorenz, P. and Eck, J. (2004) Screening for novel industrial biocatalysts. *Eng. Life Sci.*, **4,** 501–504.

[٦٧] Reetz, M.T. and Rüggeberg, C.J. (2002) A screening system for enantioselective enzymes based on differential cell growth. *Chem. Commun.*, 1428–1429.

[٦٨] Jurgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M., and Sterner, R. (2000) Directed evolution of a (beta alpha)(8)-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97,** 9925–9930.

[٦٩] MacBeath, G., Kast, P., and Hilvert, D. (1998) Redesigning enzyme topology by directed evolution. *Science*, **279,** 1958–1961.

[٧٠] Crameri, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., and Stemmer, W.P.C. (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, **391,** 288–291.

[٧١] Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J., and Meyer, H.H. (1999) Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. *Bioorg. Med.Chem.*, **7,** 2169–2173.

[٧٢] Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J., and Meyer, H.H. (1998) Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones. *Biotechnol. Bioeng.*, **58,** 554–559.

[٧٣] Joo, H., Arisawa, A., Lin, Z.L., and Arnold, F.H. (1999) A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases. *Chem. Biol.*, **6,** 699–706.

[٧٤] Matsumura, I., Wallingford, J.B., Surana, N.K., Vize, P.D., and Ellington, A.D. (1999) Directed evolution of the surface chemistry of the reporter enzyme beta-glucuronidase. *Nat. Biotechnol.*, **17,** 696–701.

[٧٥] Joo, H., Lin, Z.L., and Arnold, F.H. (1999) Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature*, **399,** 670–673.

[٧٦] Bylina, E.J., Coleman, W.J., Dilworth, M.R., Robles, S.J., Tanner, M.A., Yang, M.M., and Youvan, D.C. (2000) Solid-phase enzyme screening. *ASM News*, **66,** 211–217.

[٧٧] Babiak, P. and Reymond, J.L. (2005) A high-throughput, low-volume enzyme assay on solid support. *Anal. Chem.*, **77,** 373–377.

[٧٨] Baumann, M., St ü rmer, R., and Bornscheuer, U.T. (2001) A high-throughput-screening method for the identifi cation of active and enantioselective hydrolases. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40,** 4201–4204.

[٧٩] Schmidt, M., Hasenpusch, D., K ä hler, M., Kirchner, U., Wiggenhorn, K., Langel, W., and Bornscheuer, U.T. (2006) Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* yields a mutant with excellent enantioselectivity and activity for the kinetic resolution of a chiral building block. *ChemBioChem*, **7,** 805–809.

[٨٠] Grognux, J., Wahler, D., Nyfeler, E., and Reymond, J.L. (2004) Universal chromogenic substrates for lipases and esterases. *Tetrahedron Asymmetry*, **15,** 2981–2989.

[٨١] Klein, G. and Reymond, J.L. (1998) An enantioselective fluorimetric assay for alcohol dehydrogenases using albumin-catalyzed beta-elimination of umbelliferone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8,** 1113–1116.

[٨٢] Leroy, E., Bensel, N., and Reymond, J.L. (2003) A low background high-throughput screening (HTS) fluorescence assay for lipases and esterases using acyloxymethylethers of umbelliferone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13,** 2105–2108.

[٨٣] Grognux, J. and Reymond, J.L. (2004) Classifying enzymes from selectivity fingerprints. *ChemBioChem*, **5,** 826–831.

[٨٤] Wahler, D., Boujard, O., Lefevre, F., and Reymond, J.L. (2004) Adrenaline profiling of lipases and esterases with 1,2-diol and carbo-hydrate acetates. *Tetrahedron*, **60,** 703–710.

[٨٥] Wahler, D. and Reymond, J.L. (2002) The adrenaline test for enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41,** 1229–1232.

[٨٦] Janes, L.E. and Kazlauskas, R.J. (1997) Quick E. A fast spectroscopic method to measure the enantioselectivity of hydrolases. *J. Org. Chem.*, **62,** 4560–4561.

[٨٧] Somers, N.A. and Kazlauskas, R.J. (2004) Mapping the substrate selectivity and enantioselectivity of esterases from thermophiles. *Tetrahedron Asymmetry*, **15,** 2991–3004.

[٨٨] Liu, A.M.F., Somers, N.A., Kazlauskas, R.J., Brush, T.S., Zocher, F., Enzelberger, M.M., Bornscheuer, U.T., Horsman, G.P., Mezzetti, A., Schmidt-Dannert, C., and Schmid, R.D. (2001) Mapping the substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening: lipases from *Bacillus thermocatenulatus* and *Phiostoma piliferum*, esterases from *Pseudomonas fluorescens* and *Streptomyces diastatochromogenes*. *Tetrahedron Asymmetry*, **12,** 545–556.

[٨٩] Horsman, G.P., Liu, A.M.F., Henke, E., Bornscheuer, U.T., and Kazlauskas, R.J. (2003) Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* esterase toward methyl 3-bromo-2-methylpropanoate and ethyl 3-phenylbutyrate. *Chem. Eur. J.*, **9,** 1933–1939.

[٩٠] Reetz, M.T., Kühling, K.M., Wilensek, S., Husmann, H., Häusig, U.W., and Hermes, M. (2001) A GC-based method for high-throughput screening of enantioselective catalysts. *Catal. Today*, **67,** 389–396.

[٩١] Reetz, M.T., Becker, M.H., Klein, H.W., and Stöckigt, D. (1999) A method for high-throughput screening of enantioselective catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38,** 1758–1761.

[٩٢] Reetz, M.T., Kühling, K.M., Deege, A., Hinrichs, H., and Belder, D. (2000) Super-high-throughput screening of enantioselective catalysts by using capillary array electrophoresis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39,** 3891–3893.

[٩٣] Fibla, J. and Gonzalezduarte, R. (1993) Colorimetric assay to determine alcohol-dehydrogenase activity. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **26,** 87–93.

[٩٤] Mayer, K.M. and Arnold, F.H. (2002) A colorimetric assay to quantify dehydrogenase activity in crude cell lysates. *J. Biomol. Screen.*, **7,** 135–140.
[٩٥] Tsotsou, G.E., Cass, A.E.G., and Gilardi, G. (2002) High throughput assay for cytochrome P450 BM3 for screening libraries of substrates and combinatorial mutants. *Biosens. Bio-electron.*, **17,** 119–131.
[٩٦] Yang, G.Y. and Shamsuddin, A.M. (1996) Gal-GalNAc: a biomarker of colon carcinogenesis. *Histol. Histopathol.*, **11,** 801–806.
[٩٧] Gabler, M., Hensel, M., and Fischer, L. (2000) Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases. *Enzyme Microb. Technol.*, **27,** 605–611.
[٩٨] Zhu, Z., Wang, M., Gautam, A., Nazor, J., Momeu, C., Prodanovic, R., and Schwaneberg, U. (2007) Directed evolution of glucose oxidase from *Aspergillus niger* for ferrocenemethanol-mediated electron transfer. *Biotechnol. J.*, **2,** 241–248.
[٩٩] Lin, Z.L., Thorsen, T., and Arnold, F.H. (1999) Functional expression of horseradish peroxidase in *E. coli* by directed evolution. *Biotechnol. Prog.*, **15,** 467–471.
[١٠٠] Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., and Pedersen, A.H. (1999) Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.*, **17,** 379–384.
[١٠١] Morawski, B., Quan, S., and Arnold, F.H. (2001) Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae. Biotechnol. Bioeng.*, **76,** 99–107.
[١٠٢] Iffl and, A., Gendreizig, S., Tafelmeyer, P., and Johnsson, K. (2001) Changing the substrate specifi city of cytochrome c peroxidase using directed evolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286,** 126–132.
[١٠٣] Wilming, M., Iffland, A., Tafelmeyer, P., Arrivoli, C., Saudan, C., and Johnsson, K. (2002) Examining reactivity and specificity of cytochrome c peroxidase by using combinatorial mutagenesis. *ChemBioChem*, **3,** 1097–1104.
[١٠٤] Li, Q.S., Schwaneberg, U., Fischer, M., Schmitt, J., Pleiss, J., Lutz-Wahl, S., and Schmid, R.D. (2001) Rational evolution of a medium chain-specific cytochrome P-450 BM-3 variant. *Biochim. Biophys. Acta*, **1545,** 114–121.
[١٠٥] Wong, T.S., Arnold, F.H., and Schwaneberg, U. (2004) Laboratory evolution of cytochrome P450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnol. Bioeng.*, **85,** 351–358.
[١٠٦] Farinas, E.T., Schwaneberg, U., Glieder, A., and Arnold, F.H. (2001) Directed evolution of cytochrome P450 monooxygenase for alkane oxidation. *Adv. Synth. Catal.*, **343,** 601–606.
[١٠٧] Tee, K.L. and Schwaneberg, U. (2006) A screening system for the directed evolution of epoxygenases: importance of position 184 in P450 BM3 for stereoselective styrene epoxidation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45,** 5380–5383.
[١٠٨] Reisinger, C., van Assema, F., Schürmann, M., Hussain, Z., Remler, P., and Schwab, H. (2006) A versatile colony assay based on NADH fluorscence. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **39,** 149–155.
[١٠٩] Selmar, D., Catvalho, F.J.P., and Conn, E.E. (1987) A colorimetric assay for α-hydroxynitrile lyase. *Anal. Biochem.*, **166,** 208–211.
[١١٠] K ö nig, W. (1904) *J. Prakt. Chem.*, **69,** 105–137.
[١١١] Andexer, J., Guterl, J.K., Pohl, M., and Eggert, T. (2006) A high-throughput screening assay for hydroxynitrile lyase activity. *Chem. Commun.*, 4201–4203.
[١١٢] Feigl, F. and Anger, V. (1966) Replacement of benzidine by copper ethylacetoacetate and tetra base as spot-test reagent for hydrogen cyanide and cyanogen. *Analyst*, **91,** 282–284.
[١١٣] Krammer, B., Rumbold, K., Tschemmernegg , M., Pöchlauer, P., and Schwab, H. (2006) A novel screening assay for hydroxynitrile lyases suitable for high-throughput screening. *J. Biotechnol.*, **129,** 151–161.
[١١٤] Moore, J.C. and Arnold, F.H. (1996) Directed evolution of a *para*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat. Biotechnol.*, **14,** 458–467.
[١١٥] Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P.O., and Arnold, F.H. (1998) Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95,** 12809–12813.
[١١٦] Henke, E., Bornscheuer, U.T., Schmid, R.D., and Pleiss, J. (2003) A molecular mechanism of enantiorecognition of tertiary alcohols by carboxylesterases. *ChemBioChem*, **4,** 485–493.
[١١٧] Heinze, B., Kourist, R., Fransson, L., Hult, K., and Bornscheuer, U.T. (2007) Highly enantioselective kinetic resolution of two tertiary alcohols using mutants of an esterase from *Bacillus subtilis. Protein Eng. Des. Sel.*, **20,** 125–131.

[١١٨] Kourist, R., Bartsch, S., and Bornscheuer, U.T. (2007) Highly enantioselective synthesis of arylaliphatic tertiary alcohols using mutants of an esterase from *Bacillus subtilis. Adv. Synth. Catal.,* **349,** 1393–1398.

[١١٩] Bartsch, S., Kourist, R., and Bornscheuer, U.T. (2008) Complete inversion of enantioselectivity towards acetylated tertiary alcohols by a double mutant of a *Bacillus subtilis* esterase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,* **47,** 1508–1511.

[١٢٠] Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., and Jaeger, K.E. (2000) Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem. Biol.,* **7,** 709–718.

[١٢١] Reetz, M.T., Wilensek, S., Zha, D., and Jaeger, K.E. (2001) Directed evolution of an enantioselective enzyme through combinatorial multiple-cassette mutagenesis. *Angew. Chem. Int. Ed.,* **40,** 3589–3591.

[١٢٢] Reetz, M.T., Puls, M., Carballeira, J.D., Vogel, A., Jaeger, K.E., Eggert, T., Thiel, W., Bocola, M., and Otte, N. (2007) Learning from directed evolution: further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *ChemBioChem,* **8,** 106–112.

[١٢٣] Henke, E. and Bornscheuer, U.T. (1999) Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens.* Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufi n-based fluorescence assay. *Biol. Chem.,* **380,** 1029–1033.

[١٢٤] Anderson, E.M., Larsson, K.M., and Kirk, O. (1998) One biocatalyst–many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal. Biotransformation,* **16,**181–204.

[١٢٥] Zhang, N., Suen, W.C., Windsor, W., Xiao, L., Madison, V., and Zaks, A. (2003) Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein Eng.,* **16,** 599–605.

[١٢٦] Suen, W.C., Zhang, N., Xiao, L., Madison, V., and Zaks, A. (2004) Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling. *Protein Eng., Des. Sel.,* **17,** 133–140.

[١٢٧] Koga, Y., Kato, K., Nakano, H., and Yamane, T. (2003) Inverting enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* KWI-56 Lipase by combinatorial mutation and high-throughput screening using single-molecule PCR and *in vitro* expression. *J. Mol. Biol.,* **331,** 585–592.

[١٢٨] van Kampen, M.D., and Egmond, M.R. (2000) Directed evolution: from a staphylococcal lipase to a phospholipase. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.,* **102,** 717–726.

[١٢٩] Kauffmann, I., and Schmidt-Dannert, C. (2001) Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design. *Protein Eng.,* **14,** 919–928.

[١٣٠] Joerger, R.D., and Haas, M.J. (1994) Alteration of chain length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis. *Lipids,* **29,** 377–384.

[١٣١] DeSantis, G., Wong, K., Farwell, B., Chatman, K., Zhu, Z., Tomlinson, G., Huang, H., Tan, X., Bibbs, L., Chen, P., Kretz, K., and Burk, M.J. (2003) Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through Gene Site Saturation Mutagenesis (GSSM). *J. Am. Chem. Soc.,* **125,** 11476–11477.

[١٣٢] Gray, K.A., Richardson, T.H., Kretz, K., Short, J.M., Bartnek, F., Knowles, R., Kan, L., Swanson, P.E., and Robertson, D.E. (2001) Rapid evolution of reversible denaturation and elevated melting temperature in a microbial haloalkane dehalogenase. *Adv. Synth. Catal.,* **343,** 607–617.

[١٣٣] Short, J.M. (2001) Saturation mutagenesis in directed evolution, US Patent 6171820.

[١٣٤] Breuer, M. and Hauer, B. (2003) Carbon-carbon coupling in biotransformation. *Curr. Opin. Biotechnol.,* **14,** 570–576.

[١٣٥] Fessner, W.D. (2000) Enzymatic synthesis using aldolases, in *Stereoselective Biocatalysis* (ed. R.N. Patel), Marcel Dekker, New York, pp. 239–265.

[١٣٦] Liu, J., Hsu, C.C., and Wong, C.H. (2004) Sequential aldol condensation catalyzed by DERA mutant Ser238Asp and a formal total synthesis of atorvastatin. *Tetrahedron Lett.,* **45,** 2439–2441.

[١٣٧] Jennewein, S., Sch ü rmann, M., Wolberg, M., Hilker, I., Luiten, R., Wubbolts, M., and Mink, D. (2006) Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase. *Biotechnol. J.,* **1,** 537–548.

[١٣٨] Greenberg, W.A., Varvak, A., Hanson, S.R., Wong, K., Huang, H., Chen, P., and Burk, M.J. (2004) Development of an efficient, scalable, aldolase-catalyzed process for enantioselective synthesis of statin intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **101,** 5788–5793.

[١٣٩] Sugiyama, M., Hong, Z., Greenberg, W.A., and Burk, M.J. (2007) *In vivo*. selection for the directed evolution of L-rhamnulose aldolase from L-rhamnulose - 1-phosphate aldolase (Rha D). *Bioorg. Med. Chem.*, **15,** 5905–5911.

[١٤٠] Fong, S., Machajewski, T.D., Mak, C.C., and Wong, C.H. (2000) Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D-and L-sugars. *Chem. Biol.*, **7,** 873–883.

[١٤١] Ran, N. and Frost, J.W. (2007) Directed evolution of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogalactonate aldolase to replace 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, **129,** 6130–6139.

[١٤٢] Dean, S.M., Greenberg, W.A., and Burk, M.J. (2007) Recent advances in aldolase-catalyzed asymmetric synthesis. *Adv. Synth. Catal.*, **349,** 1308–1320.

[١٤٣] Samland, A. and Sprenger, G.A. (2006) Microbial aldolases as C-C bonding enzymes–unknown treasures and new developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71,** 253–264.

[١٤٤] Franke, D., Hsu, C.C., and Wong, C.H. (2004) Directed evolution of aldolases. *Methods Enzymol.*, **388,** 224–238.

[١٤٥] Kim, J.S., Choi, G.S., Kim, S.B., Kim, W.H., Lee, J.Y., Ryu, Y.W., and Kim, G.J. (2004) Enhanced thermostability and tolerance of high substrate concentration of an esterase by directed evolution. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **27,** 169–175.

[١٤٦] May, O., Nguyen, P.T., and Arnold, F.H. (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine . *Nat. Biotechnol.*, **18,** 317–320.

[١٤٧] Miyazaki, K., Wintrode, P.L., Grayling, R.A., Rubingh, D.N., and Arnold, F.H. (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.*, **297,** 1015–1026.

[١٤٨] Ness, J.E., Welch, M., Giver, L., Bueno, M., Cherry, J.R., Borchert, T.V., Stemmer, W.P.C., and Minshull, J. (1999) DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. *Nat. Biotechnol.*, **17,** 893–896.

[١٤٩] Ness, J.E., Kim, S., Gottman, A., Pak, R., Krebber, A., Borchert, T.V.,Govindarajan, S., Mundorff, E.C., and Minshull, J. (2002) Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. *Nat. Biotechnol.*, **20,** 1251–1255.

[١٥٠] Tomschy, A., Brugger, R., Lehmann, M., Svendsen, A., Vogel, K., Kostrewa, D., Lassen, S.F., Burger, D., Kronenberger , A., van Loon, A.P.G.M., Pasamontes, L., and Wyss, M. (2002) Engineering of phytase for improved activity at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68,** 1907–1913.

[١٥١] Turunen, O., Vuorio, M., Fenel, F., and Leisola, M. (2002) Engineering of multiple arginines into Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4-β-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein Eng.*, **15,** 141–145.

[١٥٢] Hirata, A., Adachi, M., Utsumi, S., and Mikami, B. (2004) Engineering of the pH optimum of *Bacillus cereus* β-amylase: conversion of the pH optimum from abacterial type to a higher-plant type. *Biochemistry*, **43,** 12523–12531.

[١٥٣] Hirata, A., Adachi, M., Sekine, A., Kang, Y.N., and Utsumi, S. (2004) Structural and enzymatic analysis of soybean β-amylase with increased pH optimum. *J. Biol. Chem.*, **279,** 7287–7295.

[١٥٤] Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K.H., and Schmid, R.D. (2003) Directed evolution of a bacterial α-amylase: toward enhanced pH-performance and higher specifi c activity. *Protein Sci.*, **12,** 2141–2149.

[١٥٥] Sriprapundh, D., Vieille, C., and Zeikus, J.G. (2003) Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH. *Protein Eng.*, **16,** 683–690.

[١٥٦] Glieder, A., Farinas, E.T., and Arnold, F.H. (2002) Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat. Biotechnol.*, **20,** 1135–1139.

[١٥٧] Peters, M.W., Meinhold, P., Glieder, A., and Arnold, F.H. (2003) Regio-and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450 BM-3. *J. Am. Chem. Soc.*, **125,** 13442–13450.

[١٥٨] Bruhlmann, F. and Chen, W. (1999) Tuning biphenyl dioxygenase for extended substrate specificity. *Biotechnol. Bioeng.*, **63,** 544–551.

[١٥٩] Canada, K.A., Iwashita, S., Shim, H., and Wood, T.K. (2002) Directed evolution of toluene *ortho*-monooxygenase for enhanced 1-naphthol synthesis and chlorinated ethene degradation. *J. Bacteriol.*, **184,** 344–349.

[١٦٠] Bosma, T., Damborsky, J., Stucki, G., and Janssen, D.B. (2002) Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68,** 3582–3587.

[١٦١] Oh, K.H., Nam, S.H., and Kim, H.S. (2002) Improvement of oxidative and thermostability of *N*-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase by directed evolution. *Protein Eng.*, **15,** 689–695.

[١٦٢] Otten, L.G., Sio, C.F., Vrielink, J., Cool, R.H., and Quax, W.J. (2002) Altering the substrate specificity of cephalosporin acylase by directed evolution of the beta-subunit. *J. Biol. Chem.*, **277,** 42121–42127.

[١٦٣] Sio, C.F., Riemens, A.M., van der Laan, J.M., Verhaert, R.M.D., and Quax, W.J. (2002) Directed evolution of a glutaryl acylase into an adipyl acylase. *Eur. J. Biochem.*, **269,** 4495–4504.

[١٦٤] Lingen, B., Kolter-Jung, D., Dunkelmann, P., Feldmann, R., Grotzinger, J., Pohl, M., and Muller, M. (2003) Alteration of the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by directed evolution. *ChembioChem,* **4,** 721–726.

[١٦٥] Yang, H., Carr, P.D., McLoughlin, S.Y., Liu, J.W., Horne, I., Qiu, X., Jeffries, C.M.J., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., and Ollis, D.L. (2003) Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution. *Protein Eng.*, **16,** 135–145.

[١٦٦] Carr, R., Alexeeva, M., Dawson, M.J., Gotor-Fernandez, V., Humphrey, C.E., and Turner, N.J. (2005) Directed evolution of an amine oxidase for the preparative deracemisation of cyclic secondary amines. *ChemBioChem,* **6,** 637–639.

[١٦٧] Alexeeva, M., Carr, R., and Turner, N.J. (2003) Directed evolution of enzymes: new biocatalysts for asymmetric synthesis. *Org. Biomol. Chem.*, **1,** 4133–4137.

[١٦٨] Genzel, Y., Archelas, A., Spelberg, J.H.L., Janssen, D.B., and Furstoss, R. (2001) Microbiological transformations. Part 48: Enantioselective biohydrolysis of 2-, 3-and 4-pyridyloxirane at high substrate concentration using the *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolase and its Tyr215Phe mutant. *Tetrahedron,* **57,** 2775–2779.

[١٦٩] Spelberg, J.H.L., Rink, R., Archelas, A., Furstoss, R., and Janssen, D.B. (2002) Biocatalytic potential of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 and a mutant with enhanced enantioselectivity. *Adv. Synth. Catal.*, **344,** 980–985.

[١٧٠] Rink, R., Spelberg, J.H.L., Pieters, R.J., Kingma, J., Nardini, M., Kellogg, R.M., Dijkstra, B.W., and Janssen, D.B. (1999) Mutation of tyrosine residues involved in the alkylation half reaction of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 results in improved enantioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.*, **121,** 7417–7418.

[١٧١] van Loo, B., Spelberg, J.H.L., Kingma, J., Sonke, T., Wubbolts, M.G., and Janssen, D.B. (2004) Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling. *Chem. Biol.*, **11,** 981–990.

obeikandl.com

الفصل الخامس

الإنتاج الصناعي للإنزيمات
THE INDUSTRIAL PRODUCTION OF ENZYMES

ريتا راني سينغانيا، أنيل كومار باتيل، و أشوك باندي

Reeta Rani Singhania, Anil Kumar Patel, and Ashok Pandey

(١ , ٥) المقدمة Introduction

الإنزيمات هي جزيئات بروتينية (ما عدا الريبوزيمات، التي هي جزيئات الحمض النووي الريبوزي، RNA) تحفز التفاعلات الكيميائية الحيوية. في التفاعلات الإنزيمية، يتم تحويل الجزيئات في بداية العملية، التي تدعى أوساط تفاعل، إلى جزيئات مختلفة، المنتجات. وتزيد الإنزيمات من سرعة التفاعل عن طريق تكوين متراكبات مع وسط التفاعل في مرحلة انتقالية، والتي تقلل من طاقة تنشيط التفاعل. وتعدُّ الإنزيمات جذابة للأغراض الصناعية؛ بسبب فعاليتها وانتقائيتها في التفاعلات الكيميائية التي تقوم بتسريعها، وهي تتصرف بطريقة مماثلة للمحفزات غير العضوية المستخدمة في الصناعة الكيميائية.

وتقنية الإنزيمات هي مجال متداخل التخصصات، وتستخدم الإنزيمات بصفة روتينية في كثيرٍ من القطاعات الصناعية غير الضارة بالبيئية. وقد فتحت التطورات الأخيرة في مجال التقنية الحيوية، وخصوصاً في مجالات الهندسة الوراثية والبروتينية، ساحة جديدة لتطبيق الكثير من الإنزيمات في العمليات الصناعية. وتعدُّ الإنزيمات الصناعية بمثابة القلب من العمليات الحيوية. وقد شهدت الكثير من مبادرات البحث والتطوير R&D الكبرى، ليس فقط تطوير عدد من المنتجات الجديدة، ولكن أيضاً تحسينات في العملية وأداء الكثير من العمليات القائمة. وتحتاج جميع العمليات تقريباً في الخلية الحيوية إلى الإنزيمات لكي تتم بمعدلات ذات دلالة. وحيث إن الإنزيمات انتقائية لأوساط تفاعلاتها وتزيد من سرعة القليل من التفاعلات فقط من بين الكثير من الاحتمالات، فإن مجموعة الإنزيمات الموجودة في الخلية تحدد المسارات الأيضية التي تحدث في الخلية.

وقد استخدمت الإنزيمات على مر التاريخ البشري في صناعة الجبن وتصنيع الغذاء بصورة غير مباشرة عن طريق الخمائر والبكتيريا. وقد استخدمت الإنزيمات المعزولة في المنظفات للمرة الأولى في عام ١٩١٤م، على الرغم

من عدم إثبات طبيعتها البروتينية حتى عام ١٩٢٦م، وقد بدأ الإنتاج البكتيري على نطاق كبير في ستينيات القرن العشرين. وتنمو تجارة الإنزيمات الصناعية باطراد؛ بسبب تحسين تقنيات الإنتاج، وهندسة خصائص الإنزيم، والتطبيقات الجديدة.

(٥ , ٢) إنتاج الإنزيم Enzyme Production

تنتج معظم الإنزيمات تجارياً بواسطة الكائنات الدقيقة من خلال التخمير المغمور، على الرغم من أن بعضها ينتج خلال التخمير الصلب. وتنتج الإنزيمات الصناعية الكبرى من الكائنات الحية الدقيقة المعترف بها عموماً ككائنات آمنة الاستخدام GRAS-Status في مفاعلات حيوية كبيرة تدعى المخمرات. ومع ذلك، لا يزال استخراج بعض الإنزيمات يتم من الأنسجة الحيوانية أو النباتية. وتشمل الإنزيمات التجارية المشتقة من النباتات الإنزيمات المحللة للبروتين البابين، البروميلين، والفايسين وبعض الإنزيمات التخصصية الأخرى، مثل إنزيم الليبوكسيجينيز من فول الصويا. وتشمل الإنزيمات المشتقة من الحيوانات الإنزيمات المحللة للبروتين مثل إنزيم الببسين والمنفحة. عادة ما يتم تعديل الكائن الدقيق المنتج وكذلك الإنزيم وراثياً للإنتاجية القصوى والخصائص المطلوبة للإنزيم. وتعتمد خطوات المعاملة النهائية للإنزيمات الصناعية على درجة النقاء المطلوبة، والتي تعتمد بدورها على التطبيق. وعادة لا تتم تنقية الإنزيمات الصناعية التي تنتج بأحجام كبيرة، ولكنها تباع على صورة سوائل مركزة أو حبيبات منتجات جافة. والإنزيمات المستخدمة في التطبيقات الخاصة، مثل تقنيات التشخيص أو الحمض النووي تحتاج إلى أن تكون نقية بصورة عالية جداً.

ويمكن تقسيم عملية إنتاج الإنزيم إلى مراحل كما هو مبين في الشكل رقم (١ , ٥).

(١ , ٢ , ٥) اختيار الإنزيم المناسب Selection of a Suitable Enzyme

تشمل المعايير المستخدمة في اختيار الإنزيم الصناعي التخصصية، ومعدل التفاعل، ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة القصوى والثبات، وتأثير المثبطات، والانجذاب إلى أوساط التفاعل. وهناك إنزيمات خاصة مطلوبة بخصائص معينة على أساس التطبيقات، على سبيل المثال ينبغي ألاَّ تحتوي الإنزيمات المستخدمة في صناعة الورق على نشاط محلل للسليولوز كنشاط جانبي؛ لأن هذا سيضر بألياف السليلوز. يجب أن تتحمل الإنزيمات المستخدمة في صناعة العلف الحيواني درجات الحرارة لتنجو من عملية الدفع الساخنة المستخدمة في تصنيع العلف الحيواني، ولكن في الوقت نفسه يجب أن يكون لها درجة نشاط قصوى في درجة حرارة جسم الحيوان. ويجب أن تتحمل الإنزيمات المستخدمة في التطبيقات الصناعية عادة مختلف المعادن الثقيلة ولا تحتاج إلى العوامل المساعدة.



الشكل رقم (١ , ٥). الخطوات المستخدمة في إنتاج الإنزيم.

(٢ , ٢ , ٥) اختيار سلالة إنتاج مناسبة Selection of a Suitable Production Strain

يتعين مراعاة عدة جوانب عند اختيار مصدر مناسب لإنتاج الإنزيم. الكائنات الدقيقة هي المصدر المفضل للإنزيمات الصناعية بدلاً من النباتات أو الحيوانات؛ وذلك بسبب معدل تكاثرها السريع وسهولة زراعتها. خلال العقود القليلة الماضية، ازداد استخدام الفطريات الخيطية لإنتاج منتجات الأيض الأولية والثانوية بسرعة. بوجهٍ عام، تفضل الكائنات المنتجة للإنزيم خارج الخلية على الكائنات المنتجة للإنزيم داخل الخلية؛ لأن عمليات الاسترداد والتنقية تكون أبسط بكثير؛ فالإنزيمات المنتجة داخل الخلايا يجب تنقيتها من بين آلاف البروتينات الخلوية المختلفة والمكونات الأخرى. ثانياً، ينبغي أن يكون الكائن المنتج آمن الاستخدام (GRAS-Status)، وهذا أمر مهم خصوصاً عند استخدام الإنزيم المنتج في العمليات الغذائية. ثالثاً، ينبغي للكائن أن يكون قادراً على إنتاج كميات كبيرة من الإنزيم المطلوب في فترة زمنية معقولة.

وقد مكَّنَتْ التطورات الجديدة في الفحص من البدء بالظروف المثلى للعملية، تقرير الخصائص المطلوبة للمحفز الحيوي (الإنزيم)، والتحول من خلال التنوع الحيوي الطبيعي للمحفز الحيوي المثالي [١]. بالإضافة إلى

obeikandi.com

ذلك، يمكن دفع المحفزات الحيوية المتاحة لأقصى ظروف التشغيل والقيود المادية للبروتينات عن طريق التطور الموجه أو خلط الجينات [٢-٤]. ويخلق تطوير أساليب فعالة لإنشاء ومعاملة التنوع تحديات جديدة في مناهج الفحص ويسبب اتجاهاً نحو المعالجة الروبوتية، والمعدات الجديدة (على سبيل المثال، الكهربية الشعرية الموازية، وصفائف الثرمستور)، والفلوروفورات والكروموفورات الجديدة، والمناهج الجديدة للكشف عن الانتقائية المجسمة [٥]. بالإضافة إلى ذلك، أصبح الكثير من المصادر الجديدة للإنزيمات متاحاً مثل الكائنات المتحملة للظروف القاسية [٦-١٠]، والكائنات غير القابلة للزراعة (www.diversa.com)، وتسلسلات الجينوم الكاملة (www.ncbi.com).

إن استخدام السلالات الأصلية من الكائنات الدقيقة الحية له الكثير من المزايا؛ لأنها في كثيرٍ من الأحيان تنتج خليط من الإنزيمات اللازمة لتحليل أوساط التفاعل المعقدة. ولكن بعض الكائنات الدقيقة الحية الأصلية ليس من السهل تصعيد عملية إنتاجها، وقد يشكل بعضهم مخاطر على السلامة. في معظم الحالات، يمتلك الكائن الحي الدقيق المعدل وراثياً مدى أكبر من الإنزيمات ذات الخصائص المختلفة، مثل تحسين النشاط أو التخصصية، والاستخدام الآمن، وانخفاض المحتوى من البروتينات الخارجية. وعادة ما تنتج السلالات الصناعية أكثر من ٥٠ جم/ لتر من بروتينات الإنزيم خارج الخلية. ومعظم الإنزيمات الصناعية تنتج بواسطة ميكروبات قليلة نسبياً، مثل فطريات الأسبرجلس والترايكوديرما، وفطر الإستربتوميسيس إمبرفيكتاي، والبكتيريا العصوية. والخمائر ليست جيدة لإنتاج الإنزيمات خارج الخلية ونادراً ما تستخدم لهذا الغرض.

(٥,٢,٣) طريقة الإنتاج Production Methodology

بعد اختيار الكائنات الحية الدقيقة، يجب تطوير عملية الإنتاج. وقد استخدم تخمير الزراعة المغمورة على نطاقٍ واسع للإنتاج الصناعي من الإنزيمات حتى الآن، ولكن تكتسب تخميرات الزراعة بالحالة الصلبة الاهتمام في جميع أنحاء العالم بسرعة لإنتاج منتجات الأيض الأولية والثانوية [١١-١٣]. ويتيح استخدام المخلفات الزراعية الصناعية مزايا محتملة في عمليات تخمير الحالة الصلبة [١٤-١٧]. ويشمل تحسين عملية التخمير اختيار تكوين البيئة الغذائية، وطريقة الزراعة، وظروف العملية بغض النظر عن نوع العمليات الحيوية ويجب بذل المزيد من الجهد والوقت لإنجاز هذه المهام. وقبل البدء في أي عملية حيوية، يجب النظر إلى جوانب عدة: هل الكائن محل الدراسة آمن؟ هل تتطلب العملية احتياطات إضافية؟ أي نوع من المواد الغذائية يحتاجها الكائن الدقيق وما هي التركيزات المثلى/ الاقتصادية لها؟ كيف ينبغي تعقيم المواد الغذائية؟ أي نوع من المفاعلات الحيوية (نقل الكتلة، والتهوية والتبريد، ومراقبة الرغوة، وأخذ العينات)؟ ما المتغيرات التي يجب قياسها، وكيف يتم التحكم في

العملية؟ ما طريقة الزراعة الأفضل لهذا الكائن الحي (زراعة ذات دفعة واحدة، أو تغذيه على دفعات، أو زراعة مستمرة)؟ ما هي الظروف المثلى للنمو، ومعدل النمو النوعي ومعدل تكوين المنتج، والعائد والإنتاجية الحجمية؟ كيف يمكن تعظيم تركيز الخلية في المفاعل؟ كيف ينبغي تحليل الخلية إذا كان المنتج داخل الخلايا، وكيف يمكن استرداد المنتج، وتنقيته، وحفظه؟ واختيار عملية التخمير هو أمر بالغ الأهمية أيضاً، ويعتمد بصورة حصرية على المنتج النهائي وتطبيقاته النهائية.

(١, ٣, ٢, ٥) التخمير بالطريقة المغمورة Submerged Fermentation

يجري معظم الإنتاج الصناعي للإنزيمات بالتخمير المغمور، وتستخدم عادة السلالات المعدلة وراثياً. والمفاعلات الحيوية للتخمير المغمور متطورة بشكلٍ جيد وتتيح التحكم المباشر (Online control) للعديد من العوامل ولا توجد مشكلة في نقل الكتلة وإزالة الحرارة. وتنتج الإنزيمات الصناعية ذات حجم الإنتاج الكبير في مخمرات ذات سعة من ٥٠–٥٠٠ م^{٣}. وتكون البيئة الغذائية في التخمير المغمور سائلة وتبقى متصلة بالكائنات الحية الدقيقة. ومن الضروري وجود إمداد من الأوكسجين في التخمير المغمور.

هناك أربع طرق رئيسة لزراعة الكائنات الحية الدقيقة في التخمير المغمور: الدفعة الواحدة، والتغذية على دفعات، ونضح الدفعة الواحدة، والزراعة مستمرة. في زراعة الدفعة الواحدة يتم تلقيح الكائنات الدقيقة في حجم ثابت من البيئة الغذائية. وفي حالة زراعة التغذية على دفعات تتم إضافة المكونات الغذائية المركزة تدريجياً إلى زراعة الدفعة الواحدة، وفي زراعة نضح الدفعة الواحدة، يتم إضافة البيئة الغذائية وسحب حجم مساوي من البيئة الغذائية المستخدمة بدون خلايا. وفي الزراعة المستمرة تضاف بيئة غذائية جديدة إلى زراعة الدفعة الواحدة في مرحلة النمو الأسي أو الإطرادي للكائن الدقيق مع سحب مقابل للبيئة الغذائية المحتوية على المنتج. وتعطي الزراعة المستمرة نمو متوازن بصورة تقريبية، مع القليل من التأرجح في المواد الغذائية، ونواتج الأيض، وأعداد الخلايا، أو الكتلة الحيوية.

غالباً ما يتم استرداد الإنزيمات المنتجة خارج الخلية بعد إزالة الخلايا (عن طريق الترشيح بأسطوانات الفراغ، أو الأجهزة الفاصلة أو الترشيح الدقيق) بواسطة الترشيح الفائق. وإذا لزم الأمر، تتم التنقية بواسطة التبادل الأيوني أو الترشيح الهلامي. ويكون المنتج إما سائل مركز مع المواد الحافظة الضرورية مثل الأملاح أو البوليولات، وإما بصورة بديلة كمنتج محبب إلى جاف غير مغبر. وينبغي أن نتذكر أن الإنزيمات هي بروتينات، ويمكن على هذا النحو أن تسبب وقد سببت في الماضي تفاعلات حساسية. لذا من الضروري اتخاذ تدابير وقائية في إنتاجها وتطبيقها.

(٢,٣,٢,٥) التخمير بالحالة الصلبة Solid-State Fermentation

التكلفة العالية لإنتاج الإنزيمات بالطريقة المغمورة تجعلها غير اقتصادية لاستخدام الكثير من الإنزيمات في عدة عمليات صناعية. وللحد من تكاليف الإنتاج، فإن التخمير بالحالة الصلبة يعد بديلاً جذاباً. وهذه هي عملية تخمير منخفضة التكلفة، ومناسبةً بصفة خاصة لتطوير العمليات الحيوية باستخدام المخلفات الزراعية. ويبدو أن التخمير بالحالة الصلبة يمتلك عدة مزايا في التقنية الحيوية، مثل زيادة إنتاجية التخمير، وارتفاع التركيز النهائي للمنتجات، وزيادة ثبات المنتج، وقلة الكبح الهدمي، وزراعة الكائنات الدقيقة المتخصصة لأوساط التفاعل غير القابلة للذوبان في الماء أو الزراعة المختلطة للفطريات المختلفة، وأخيراً وليس آخراً، انخفاض الحاجة إلى التعقيم؛ بسبب نشاط المياه المنخفض [١٨]. على الرغم من أن معظمها يتم في الوقت الحاضر في نطاق المختبر. وقد أصبح التخمير بالحالة الصلبة شعبياً حيث إن عدداً كبيراً من الإنتاج الصناعي للإنزيمات يستخدم السلالات الفطرية التي هي أكثر ملاءمة لتخمير الحالة الصلبة، حيث تماثل بيئتها الطبيعية بصفة أكثر. فتخميرات الزراعة المغمورة لا تحاكي البيئات الطبيعية للكائنات الدقيقة الأصلية.

وتصعيد العملية، والتنقية، وتقدير الكتلة الحيوية هي التحديات الرئيسة التي أدت بالباحثين إلى البحث عن حلول. وقد كان تصعيد العملية في تخمير الحالة الصلبة لفترة طويلة عاملاً مقيداً، ولكن في الآونة الأخيرة مع ظهور هندسة الكيمياء الحيوية تم تصميم عدد من المفاعلات الحيوية التي تتغلب على مشكلات تصعيد العملية، وإلى حدٍ ما، أيضاً في التحكم المباشر للعوامل الكثيرة، وكذلك نقل الحرارة والكتلة.

على الرغم أن عمليات استرداد المنتج هي أكثر تكلفة في تخميرات الحالة الصلبة، حيث تستخدم دعائم طبيعية، فإن استخدامها يفترض الخفض في تكاليف الإنتاج وعادة ما يتم الحصول على نشاط عالي للإنزيم [١٩]. وعليه، ينبغي أن يتم إجراء تقييم اقتصادي للعملية الشاملة قبل تحديد جدواها لغرضٍ ما. ويكون هذا النظام مناسباً خاصةً لإنتاج منتجات عالية القيمة مثل الإنزيمات. هناك تطبيقات خاصة حيث تكون هناك حاجة أكثر لمنتجات نهائية مركزة بكميات مرتفعة بدلاً من المنتجات النقية. على سبيل المثال، يتطلب التحويل الحيوي للكتلة الحيوية إنزيم سليوليز خام مركز، وفي صناعة الجلود تكفي إنزيمات البروتييز الخام لإزالة الشعر من الجلود.

ويشكل فصل الكتلة الحيوية تحدياً كبيراً في تخميرات الحالة الصلبة، وهذا أساسي للدراسات الحركية. وبعض الطرق غير المباشرة متاحة، مثل تقدير الجلوكوزامين، وتقدير الإرجوستيرول، وتقدير البروتين (كيلدال)، وتقدير الحمض النووي، والتغيرات في الوزن الجاف، وانبعاث ثاني أكسيد الكربون، ولكن كل هذه الطرق لها نقاط ضعف. وحديثاً تم تطوير معالجة الصور الرقمية كأداة لقياس الكتلة الحيوية في تخميرات الحالة الصلبة. يتم الحصول على الصور بواسطة مجهر مجسم وكاميرا رقمية ومعالجتها باستخدام برنامج KS400 [٢٠]. وفي الآونة

الأخيرة اعتبر تقدير امتصاص الأوكسجين ومعدل انبعاث ثاني أكسيد الكربون هما الأكثر دقة لتحديد نمو الكائنات الحية الدقيقة [٢١-٢٢].

دافع تينجيردي [٢٣] عن أن تخمير الحالة الصلبة كان مناسباً بصفةٍ خاصة لإنتاج الإنزيم المحلل للجنوسليولوز في الكثير من تطبيقات التقنية الحيوية الزراعية. لتوضيح ذلك، تم مقارنة إنتاج السليوليز في تخمير الزراعة المغمورة وتخمير الحالة الصلبة [٢٣، ٢٤]. في مخمر الزراعة المغمورة، كانت إنتاجية السليوليز عموماً ١٠ جم/ لتر، وكانت تكلفة التخمير في المتوسط في مفاعل حيوي ذو المقلب حوالي ٢٠٠ دولار أمريكي / م^{٣}. وعليه، فإن تكلفة الإنتاج للتخمير بالزراعة المغمورة دولار تقريباً ٢٠ دولاراً أمريكياً/ كجم. في تخمير الحالة الصلبة، كان مستوى الإنتاج المتوسط حوالي ١٠ملجم/ جم من الوسط، ومتوسط تكلفة التخمير فقط ٢٥ دولاراً أمريكياً / طن متري. وعليه، فإن تكلفة الوحدة من السليوليز المنتج بتخمير الحالة الصلبة تقريباً ٠,٢ دولار أمريكي/ كجم [١٦، ٢٣].

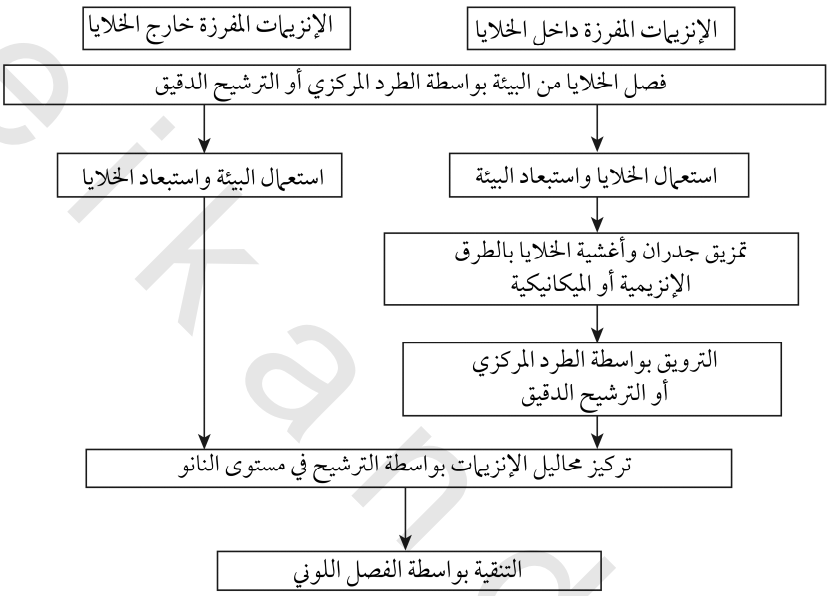
ويتوفر الكثير من المعلومات المنشورة عن إنتاج الإنزيمات ذات الأهمية الصناعية بالتخمير المغمور أو الصلب، مثل البروتييز، والسليوليزات، واللجنينزات، والزايلانيزات، والبكتينيز، والأميليز، والجلوكوأميليز، والإنيولينيزات، والفيتيز، والتنيز، واستريز الحامض الفينولي، والمنفحة الميكروبية، وأوكسيديز الكحول الأريلي، وأوكسيديز سكريات الأوليجو، وهيدروليز أسيل التانين، وألفا-أرابينوفيورانوسيديز [٢٥-٣٤].

(٤ ,٢ ,٥) المعاملة النهائية Downstream Processing

تعادل تكلفة تنقية وتكييف الإنزيمات للاستخدام النهائي، أي المعاملة النهائية، أكثر من ٥٠٪ من مجموع تكلفة إنتاج الإنزيم. وتعتمد تكلفة المعاملة النهائية على درجة النقاء المطلوبة، ومن ثم على الاستخدام النهائي للإنزيم. وبشكلٍ واضح تكون تكلفة المعاملة النهائية لإنزيم علاجي أعلى منها لإنزيم تقني بسبب النقاء المطلوبة، ويجب تحسين المعاملة النهائية بغية الحد من تكلفة الإنتاج. ويظهر الشكل رقم (٢ ,٥) الخطوات الأولية لتنقية الإنزيم.

بعد خطوات الترويق، يتم تنقية المحلول المحتوي على الإنزيمات الناتجة داخل وخارج الخلايا إضافياً بواسطة الترشيح الفائق. ويجب في هذه الخطوة الخاصة معرفة الوزن الجزيئي للبروتين المطلوب تنقيته، بحيث يمكن إزالة الشوائب مثل الأيونات والبروتينات صغيرة الوزن الجزيئي. وحتى بعد الترشيح الفائق، فإن محلول الإنزيم المركز لا يزال يحتوي على بروتينات أخرى، وأحماض نووية، وسكريات عديدة. وتتوقف إزالة هذه الشوائب بشكلٍ صارم على استخدام الإنزيم، وتعتمد أيضاً على ما إذا كانت الشوائب تثبط عمل الإنزيم كعامل

محفز في عملية معينة. وفي حالة الإنزيم المعدل وراثياً، فإن إزالة الحامض النووي ضرورية للحد من مخاطر نقل الجينات غير المرغوبة. ويفضل استخدام تقنية الفصل اللوني في تركيز الإنزيم، حيث تستخدم كمية قليلة من المادة المدمصة لادمصاص البروتين إذا كان في صورة مركزة. وعادة ما تتم تنقية الإنزيمات بالفصل اللوني. وتستخدم خصائص الإنزيم المختلفة، مثل الحجم الجزيئي، وشحنة السطح، وقابلية سطح الإنزيم للذوبان في المحاليل، لفصله باستخدام مواد مختلفة للفصل اللوني الإدمصاصي.



الشكل رقم (٢, ٥). الخطوات الأولية المستخدمة في عمليات التجهيز النهائية للإنزيمات.

وعادةً ما شملت تنقية الإنزيم من رائق مركز متجانس في السابق خمس خطوات على الأقل بما فيها الفصل اللوني، ومن الممكن خلال هذا فقد ١٠٪ من الإنزيم خلال كل خطوة تنقية، مما يؤدي إلى انخفاض استرداد الإنزيم. وتبعاً لذلك فإن زيادة استرداد الإنزيم ومن ثم تقليل خطوات التنقية مهمة جداً لخفض تكلفة الإنزيم. وقد تحسنت مؤخراً هندسة عملية الفصل اللوني إلى حدٍ كبير، بما في ذلك تطوير عملية فصل لوني مستمرة مثل محاكاة السرير المتحرك والفصل المستمر، والتي استحدثت مؤخراً في المعاملة النهائية للبروتينات [٣٥]. وعليه فمن الممكن تنقية الإنزيمات الآن مع معدل استرداد عالٍ وعدد محدود من الخطوات، مما يساعد في خفض تكلفة الإنزيم.

(٥, ٣) تحسين الإنزيم Enzyme Improvement

على الرغم من جاذبيتها العالية في عمليات التخليق الحيوية والكيميائية، فقد لا تمتلك الإنزيمات الخصائص المطلوبة عندما تعمل على نطاق صناعي. فعلى سبيل المثال، قد تفقد استقرارها أو ثباتها مع التغيرات في ظروف

التشغيل، أو نشاطها العالي في البيئات غير المائية، أو قدرتها على العمل بدون عوامل مساعدة. ولا يزال التعريف السريع والموثق لاستبدالات الأحماض الأمينية التي تولد التغييرات المطلوبة في أداء الإنزيم هو الهدف النهائي لبحوث هندسة البروتين.

ويمكن تحسين الثبات الحراري عن طريق التطفيرات موجهة المكان والتطفيرات العشوائية، وكذلك عن طريق التطفيرات الموجهة. وهذه الآن تقنيات مؤكدة.

ولقد ثبت أن الإنتاج الإفراطي للإنزيمات في كائن مناسب صعب جداً. والبديل الآخر هو أن تتم هندسة إنزيم متوفر بصورة تجارية ليكون محفزاً صناعياً بصورة أفضل. في المستقبل، قد يمكن إعادة تصميم الإنزيمات لتناسب العمليات الصناعية بصورة أفضل، على سبيل المثال، جعل إنزيم مصاوغة الجلوكوز أقل عرضة للتثبيط بواسطة الكالسيوم (٢+) الموجود في تيار معالجة تسكر النشا. ويمكن زيادة كمية الإنزيم المنتج بواسطة الكائن الحي الدقيق من خلال زيادة عدد نسخ الجين الذي يرمز لذلك الإنزيم. وقد استخدم هذا المبدأ لزيادة نشاط إنزيم البنسلين-ج-أميديز في إيشيريشيا القولون. وتعدُّ التطفيرات موجهة المكان نهج آخر لتخليق إنزيمات جديدة. وهي تشمل استبدال متدرج لحمض أميني واحد فقط أو اثنين من التركيب الكلي للبروتين.

على الرغم من توافر قاعدة بيانات كبيرة وسريعة النمو لارتباطات التسلسل بالتركيب، جنباً إلى جنبٍ مع البرمجيات اللازمة، فإنه لا يزال من المستحيل التنبؤ بدقة بالتغييرات ثلاثية الأبعاد الناتجة من إستبدالات من هذا القبيل. فالمشكلة الرئيسة هي تقييم الآثار طويلة المدى، بما في ذلك تفاعلات المذيبات على التركيب الجديد. وعلى ما يبدو، فحتى تغييرات التسلسل ولو كانت صغيرة جداً قد تؤدي إلى تغييرات كبيرة في التكوين الجزيئي، وهذه قد تؤثر في الخطوة المحددة لمعدل النشاط في الحفز الإنزيمي.

ومع ذلك، فمن المعقول أن نفترض أنه مع وجود قاعدة بيانات مفصلة بصورة كافية بالإضافة إلى البرمجيات المناسبة، فإن الإحتمال النسبي للنجاح سوف يزيد في السنوات القادمة، وسوف يكون لمنتجات هندسة البروتين تأثيراً رئيساً على تقنية الإنزيم.

(١, ٣, ٥) تقنية الحامض النووي المعدل Recombinant DNA Technology

تمثل الكائنات الحية الدقيقة المعزولة من بيئات متنوعة مصدراً للإنزيمات التي يمكن استخدامها في كيمياء العمليات الصناعية. باستخدام طرق الفرز عالية الإنتاجية (HTS) يمكن إيجاد محفزات حيوية جديدة من هذه الكائنات الحية الدقيقة. ولكن الكثير من الكائنات الحية الدقيقة ليس من السهل زراعتها في الظروف المعملية أو أن إنتاجية إنزيماتها منخفضة جداً لتكون مجدية اقتصادياً. وباستخدام تقنية الحمض النووي المعدل، فإن

استنساخ الجينات التي ترمز لهذه الإنزيمات والتعبير عنها بصورة مغايرة في السلالات الصناعية قد أصبح ممارسةً شائعة.

ويمكن الحصول على الإنزيمات الجديدة الملائمة لظروف خاصة عن طريق تعديل الكائنات الحية الدقيقة وراثياً. وتمكن تقنية الحمض النووي المعدل من إنتاج إنزيمات بمستويات أكبر بمائة ضعف من التعبير الأصلي، مما يوفرها بتكلفة منخفضة وبكميات كبيرة [٣٦]. ونتيجةً لذلك، تم توفير الكثير من إنزيمات تصنيع الغذاء المهمة، مثل الأميليز، والليبيز، مع خصائص مصممة لتطبيقات معينة في الغذاء. وقد تم هندسة عدة سلالات ميكروبية لزيادة إنتاجية الإنزيم عن طريق حذف الجينات الأصلية المرمزة لإنزيم البروتييز خارج الخلية. وعلاوةً على ذلك، فقد تم تعديل بعض السلالات الفطرية لتقليل أو القضاء على قدرتها على إنتاج منتجات الأيض الثانوية السامة [٣٧]. وهذا النهج يحول دون نقل أي حمض نووي خارجي أو غير معرف من الكائنات المانحة إلى سلالة الإنتاج.

(٢, ٣, ٥) هندسة البروتين Protein Engineering

على الرغم من أن استخدام تقنية الحمض النووي المعدل يخفض تكلفة إنتاج الإنزيم بصورة ملحوظة، فإن تطبيقات الإنزيمات المنتجة لا تزال محدودة. ومعظم المواد الكيميائية ذات الأهمية الصناعية ليست أوساط تفاعل طبيعية لهذه الإنزيمات. وإذا تم العثور على نشاط إنزيمي مرغوب، فغالبًا ما تكون الإنتاجية منخفضة. وعلاوةً على ذلك، عادة ما تكون الإنزيمات غير ثابتة في ظروف التفاعل القاسية، مثل ارتفاع أو انخفاض قيمة الرقم الهيدروجيني عن درجة ٧ الفسيولوجية، ودرجة الحرارة العالية، أو وجود المذيبات العضوية المطلوبة لإذابة الكثير من أوساط التفاعل. ومع التطورات الحديثة في تقنية تفاعل تسلسل البلمرة (PCR)، فإن التطفيرات موجهة المكان والتطفيرات العشوائية تتوفر لتحسين ثبات الإنزيم في مدى أوسع من قيم الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة وتحمل مجموعة متنوعة من المذيبات العضوية.

وحيث إنه يمكن الحصول على كمية كبيرة من الإنزيم بواسطة التعبير المؤتلف، فإنه يمكن استخدام فصل البلورات لأشعة إكس لتسهيل فهم التركيب الرباعي للإنزيم ومواضع تعرفه وارتباطه بوسط التفاعل. ويمكن أن تساعد هذه المعلومات في التصميم الرشيد للإنزيم، والتنبؤ بتغيرات الأحماض الأمينية لتغيير تخصصية وسط التفاعل، ومعدل الحفز، وانتقائية المتشابهات (في حالة التخليق الفراغي للمركب).

عادةً ما تستخدم طريقتان لإنتاج الطفرات بواسطة تفاعل تسلسل البلمرة –التطفيرات موجهة المكان العشوائية أو المشبعة، وخلط الجينات– ولهندسة إنزيم متاح تجارياً ليكون محفزاً صناعياً أفضل يوجد نهجين مختلفين

متاحين في الوقت الحاضر: طريقة عشوائية تدعى التطور الموجه (انظر الفصل الرابع)، وطريقة هندسة البروتين تسمى التصميم الرشيد.

في هندسة البروتين يتم تغيير تسلسل البروتين لتحقيق النتيجة المرجوة، مثل تغيير تخصصية وسط التفاعل أو زيادة الثبات لدرجة الحرارة، والمذيبات العضوية، و/ أو قيم الرقم الهيدروجيني المتطرفة. ويوجد الكثير من الطرق المتخصصة لهندسة البروتين، ولكن يمكن تقسيمها إلى فئتين رئيستين: التصميم الرشيد والطرق الاندماجية. ويتطلب التصميم الرشيد، مثل التطفيرات الموجهة المكان، استبدالات مستهدفة للأحماض الأمينية، وعليه يتطلب معرفة واسعة عن المحفز الحيوي قيد التحسين، بما في ذلك التركيب ثلاثي الأبعاد والآلية الكيميائية للتفاعل. والميزة الرئيسة للتصميم الرشيد هي أنه يتم خلق عدد قليل جداً من متغيرات البروتين، مما يعني أن جهداً قليلاً جداً يكون ضرورياً للكشف عن الخصائص المحسنة.

والطرق الاندماجية، من الناحية الأخرى، تخلق عدد كبير من المتغيرات والتي يجب فحصها؛ ولكن لها ميزة أنها لا تتطلب مثل هذه المعرفة الواسعة للبروتين. بالإضافة إلى ذلك، في كثير من الأحيان تؤدي التغييرات غير الواضحة في تسلسل البروتين إلى تحسينات كبيرة في خصائصها، والتي من الصعب للغاية التنبؤ بها في التصميم الرشيد، وعليه، يمكن فقط تعريفها بالطرق الاندماجية.

وقد تم بالفعل هندسة الكثير من الإنزيمات لتعمل بشكلٍ أفضل في العمليات الصناعية. وتشمل هذه البروتينيزات، والليبيزات، والسليوليزات، والألفا-أميليزات، والزيلينيزات والجلوكوأميليزات. وإنزيم الزيلينيز هو مثال جيد للإنزيم الصناعي الذي يجب أن يكون ثابتاً عند درجة الحرارة العالية ونشط في درجات الحرارة ودرجة الحموضة الفسيولوجية عند استخدامه كمادة مضافة للغذاء، وفي الظروف القلوية عند استخدامه للتبييض في صناعة اللب والورق. وأحد الكائنات المستخدمة في الإنتاج الصناعي لإنزيم الزيلينيز هو جنس التريكوديرما. وقد تم تنقية وبلورة إنزيم الزيلينيز لها، وتم زيادة ثبات الإنزيم في درجات الحرارة بحوالي ١٥ درجة مئوية بالتطفير التصميمي. وقد زادت التغيرات التطفيرية فترة عمر النصف عند درجة حرارة ٦٥ من حوالي ٤٠ ثانية إلى ما يقرب من ٢٠ دقيقة، وعند درجة حرارة ٧٠ من أقل من ١٠ ثواني إلى حوالي ٦ دقائق [٣٨]. وقد زاد هذا من ثباته الحراري عند درجة حرارة ٧٠ بحوالي ٢٠٠٠ مرة، وتم ترحيل درجة الحموضة المثلى له تجاه المنطقة القلوية بوحدة رقم هيدروجيني واحدة. وتشمل الإستراتيجيات الأكثر نجاحاً لتحسين ثبات إنزيم الزيلينيز من التريكوديرما استقرار منطقة الحلزون في الوضع ألفا والنهاية-إن.

(٥ , ٤) تطبيقات الإنزيم على المستوى الكبير Large-Scale Enzyme Applications

وجدت الإنزيمات المعزولة الكثير من التطبيقات في صناعة الكيماويات الدقيقة. وتستخدم الإنزيمات في إنتاج الأحماض الأمينية نقية التركيب الفراغي والسكريات النادرة. وتستخدم أيضاً في إنتاج سكر الفواكه (الفركتوز) ومشتقات البنسلين وكذلك غيرها من المواد الكيميائية الكثيرة. وينبغي النظر للإنزيمات بوصفها جزءاً من صناعة المحفزات الحيوية المتنامية بسرعة، والتي تشمل أيضاً الخلايا الحية المحسنة وراثياً بوصفها مصانع إنتاج للمواد الكيميائية. ويلخص الجدول رقم (١ , ٥) التطبيقات الرئيسة الكبيرة للإنزيمات.

(١ , ٤ , ٥) المنظفات Detergents

كانت المنظفات هي التطبيق الصناعي الأول للإنزيمات الميكروبية. ويشيع الآن في البلدان المتقدمة استخدام الإنزيمات في تركيبات المنظفات، حيث تحتوي نصف المنظفات المتاحة على الإنزيمات. وتأتي الأوساخ والأقذار على صورٍ كثيرة، وتشمل البروتينات والنشويات، والدهون. ويسمح استخدام الإنزيمات باستخدام درجات حرارة أقل وفترات أقصر من التقليب، وغالباً بعد فترة نقع أولية. وبشكلٍ عام، فالمنظفات الإنزيمية تزيل البروتين من الملابس المتسخة بالدم، والحليب، والعرق، والعشب، وما إلى ذلك. وهي أكثر فعالية بكثير من المنظفات غير الإنزيمية.

لا تزال البروتينيزات هي أهم إنزيمات المنظفات المستخدمة لتحليل البقع التي تسببها البروتينات. واليبيزات تحلل الدهون إلى مركبات قابلة للذوبان في الماء بصورة أكبر عن طريق تحليل الروابط الإستيرية بين جزء الجلسرين الأساسي والأحماض الدهنية. وتستخدم الأميليزات في المنظفات لإزالة البقع الناشئة من النشا. وتحلل الأميليزات النشا الجيلاتيني، الذي يميل إلى الالتصاق بألياف النسيج ويربط مكونات البقع الأخرى. وكانت السليوليزات جزءاً من المنظفات منذ أوائل تسعينيات القرن العشرين. والسليوليز هو حقيقةً متراكب إنزيمي قادر على تحليل السليولوز البلوري إلى الجلوكوز. وفي غسيل المنسوجات تزيل السليوليزات ألياف السليولوز الدقيقة التي تتكون خلال الغسيل. وهذا ينتج عنه سطوع اللون وتنعيم المادة.

(٢ , ٤ , ٥) صناعة الغذاء Food Industry

(١ , ٢ , ٤ , ٥) الخبز Baking

تم على نطاقٍ واسع دراسة علاقة الألفا-أميليزات بجودة الخبز المحسنة وزيادة فترة التخزين. وتستخدم على حدٍ سواء الأميليزات الفطرية والبكتيرية. وتحتاج الكمية المضافة إلى توخي الدقة، حيث إن الجرعة الزائدة تؤدي إلى لزوجة العجين.

الجدول رقم (١ , ٥). تطبيقات الإنزيمات المختلفة في القطاعات الصناعية المهمة.

الصناعة	الإنزيم	التطبيقات / الوظيفة / الدور
المنظفات	البروتيز السليوليز الليبيز	إزالة بقع البروتين عن طريق تحليلها فك ارتباط ألياف السليولوز لسهولة إزالة الأقذار، وسطوع اللون إزالة بقع الدهون عن طريق تحليلها
الورق واللب	الزيلينز السليوليز اللاكيز والبيروكسيديز	التبييض الحيوي نزع الأحبار من الورق لإعادة تدويره بلمرة المواد مع الألياف المرتكزة على الخشب
المنسوجات	السليوليز الأميليز الكاتاليز	أحجار الغسيل الحيوية للأقمشة القطنية، التلميع الحيوي إدخال المواد الحيوية إلى ألياف المنسوجات تنظيف التبييض
الجلود	البروتيز، الليبيز	النقع، الضرب، نزع الشعر من الجلود الحيوية
الأعلاف	الفيتز الزيلينز	إطلاق الفوسفات ذوبان الألياف
الصناعات الغذائية النشا	ألفا-، بيتا- أميليز، بوليولانيز، الإنفيرتيز، مصاوغة الجلوكوز الجلوكوز أوكسيديز	إنتاج الكثير من أنواع شراب النشا والسكروز تحسين قابلية الغذاء للتخزين عن طريق نزع الأكسجين والجلوكوز من المواد الغذائية
عصائر الفواكه	السليوليز، الزيلينز، البكتينيز	ترويق واستخلاص العصائر
المخبوزات	الزيلينز ألفا-أميليز الجلوكوز أوكسيديز	تكييف العجين حجم الرغيف، وفترة عمر الرف (التخزين) جودة العجين
الألبان	المنفحة اللاكتيز البروتيز والليبيز	تخثر البروتين تحليل اللاكتوز نضج الجبن
تخمير البيرة	الجلوكانيز البابين	وسيلة ترشيح التحكم بدرجة التعكير
الوقود الحيوي	السليوليز و بيتا-جلوكوسيديز الزيلينز	تحليل الكتلة الحيوية السليولوزية لإنتاج الجلوكوز تحليل الهيميسليولوز لإنتاج السكريات الخماسية
منتجات العناية الشخصية	البروتينيز والليبيز الجلوكوز أميليز الجلوكوز أوكسيديز	تنظيف العدسات اللاصقة تحرير الجلوكوز من المواد المرتكزة على النشا في معاجين الأسنان لتحويل الجلوكوز إلى حمض الجلوكونيك وبيروكسيد الهيدروجين، حيث يعمل كلاهما كمطهر

openarabi.com

ويأتي أحد دوافع دراسة تأثير الإنزيمات على العجين وصفات الخبز من الضغط للحد من الإضافات الأخرى. بالإضافة إلى النشا، يحتوي الدقيق عادةً على كميات ضئيلة من السليولوز، والجلوكانات، والهيميسليولوزات مثل الأرابينوزيلان والأرابينوجالاكتان. وهناك أدلة على أن استخدام الزيلنيزات يقلل من امتصاص الماء ومن ثم يقلل من كمية الماء المضافة في عملية الخبز. وهذا يؤدي إلى عجين أكثر استقراراً. وتستخدم الزيلنيزات على وجه الخصوص في خبز الشوفان الكامل والمقرمشات الجافة الشائعة في الدول الاسكندنافية.

ويمكن إضافة البروتينيزات لتحسين خصائص معالجة العجين؛ وقد استخدم الجلوكوز أوكسيديز ليحل محل المؤكسدات الكيميائية والليبيزات لتعزيز الجلوتين، الذي يؤدي إلى عجين أكثر استقراراً وتحسين نوعية الخبز.

(٢, ٢, ٤, ٥) تحليل النشا وإنتاج الفركتوز Starch Hydrolysis and Fructose Production

كان استخدام الإنزيمات المحللة للنشا أول تطبيق صناعي للإنزيمات الميكروبية في صناعة الأغذية. وهناك إنزيمان أساسيان يقومان بتحويل النشا إلى جلوكوز: الألفا-أميليز والجلوكوأميليز. في بعض الأحيان تضاف الإنزيمات غير المتفرعة مثل البوليولانيز لتحسين إنتاجية الجلوكوز. وينتج البيتا-أميليز تجارياً من حبوب الشعير ويستخدم في إنتاج السكر الثنائي المالتوز.

في الولايات المتحدة يتم تحويل كميات كبيرة من شراب الجلوكوز باستخدام إنزيم مصاوغة الجلوكوز بعد إزالة الكالسيوم$^{+٢}$ (يحتاج الألفا-أميليز الكالسيوم$^{+٢}$ للنشاط، ولكنه يثبط مصاوغة الجلوكوز) إلى شراب يحتوي على الفركتوز. ويتم ذلك بالإنزيمات البكتيرية، التي تحتاج إلى أيونات المغنيسيوم$^{+٢}$ للنشاط. ويتم فصل وبلورة الفركتوز من الجلوكوز بطرق الفصل الكروماتوجرافي كبيرة المستوى. وبدلاً من ذلك، يتم تركيز الفركتوز إلى ٥٥٪ ويستخدم كشراب ذرة عالي المحتوى من الفركتوز في صناعة المشروبات الغازية.

(٣, ٢, ٤, ٥) المشروبات والألبان Drinks and Diary

للإنزيمات الكثير من التطبيقات في مجال صناعة المشروبات. ويستخدم الكيموسين في صناعة الجبن حيث يخثر بروتين الحليب. والإنزيم الآخر الذي يستخدم في صناعة الحليب هو البيتا-جالاكتوزيديز أو اللاكتيز، الذي يقسم اللاكتوز إلى جلوكوز وسكر اللبن (الجالاكتوز). وتستخدم هذه العملية في منتجات الحليب للمستهلكين ذوي الحساسية تجاه اللاكتوز.

وتستخدم الإنزيمات أيضاً في تصنيع عصير الفاكهة. وتحسن إضافة البكتينيز، أولزيلانيز والسليوليز من تحرير العصير من اللب. وتستخدم البكتينيزات والأميليزات في ترويق العصير. وبالمثل، تستخدم الإنزيمات على

نطاقٍ واسعٍ في إنتاج النبيذ للحصول على أفضل استخلاص للمكونات الضرورية ومن ثم تحسين الإنتاجية. وتحلل الإنزيمات المواد مرتفعة الوزن الجزيئي، مثل البكتين.

ويمكن استخدام الإنزيمات لمساعدة تحليل النشا بالماء (عادةً ألفا-أميليزات)، لحل مشكلات الترشيح التي تسببها البيتا-جلوكانات الموجودة في الشعير (بيتا-جلوكانيزات)، لتحليل البروتين (البروتينيز المحايد)، والتحكم بدرجة التعكير خلال النضج، وللترشيح والتخزين (البابين، ألفا-أميليز وبيتا-جلوكانيز).

(٣, ٤, ٥) الأعلاف Animal Feed

تم استخدام إضافة الإنزيمات لأعلاف الحيوانات بشكلٍ مكثف منذ ثمانينيات القرن العشرين. فالإنزيمات تقلل اللزوجة، وتزيد امتصاص المواد الغذائية، وتحرر المواد الغذائية إما عن طريق تحليل الألياف غير القابلة للتحلل وإما عن طريق تحرير المواد الغذائية التي تمنع هذه الألياف امتصاصها، وتقلل من كمية البراز. وتضاف كمخلوطات إنزيمية أولية (مخلوط إنزيم-دقيق) خلال عملية تصنيع العلف، والتي تشمل قذف كتلة العلف الرطب عند درجات حرارة عالية (٨٠-٩٠ درجة مئوية). وهذا يعني أن إنزيمات الأعلاف يجب أن تكون متحملة للحرارة أثناء تصنيع الأعلاف ولكنها يجب أن تعمل في درجة حرارة جسم الحيوان.

وجاء النجاح التجاري الأول من إضافة البيتا-جلوكانيز لوجبات الأعلاف المعتمدة على الشعير. ويحتوي الشعير على البيتا-جلوكان، والذي يسبب لزوجة عالية في أمعاء الدجاج. وكان التأثير النهائي لاستخدام الإنزيم في علف الحيوان هو زيادة الوزن المكتسب للحيوان مع نفس الكمية من الشعير، مما أدى إلى زيادة نسبة تحويل الأعلاف. وزادت إضافة الزيلانيز إلى علف الفروج المعتمد على القمح من الطاقة التمثيلية المتاحة بنسبة ٧-١٠٪ في مختلف الدراسات.

وإنزيم آخر مهم في الأعلاف هو الفيتيز، وهو فسفوإستريز يحرر الفوسفات من حامض الفيتيك. ويوجد حمض الفيتيك عادة في مواد الأعلاف النباتية. وينتج عن التدعيم بالفيتيز خفض الفوسفور في البراز، مما يؤدي إلى خفض التلوث البيئي. كما أنه يقلل أيضاً الحاجة لإضافة الفوسفور إلى العلف. ويعدُّ الفيتيز حالياً واحداً من أقوى إنزيمات الأعلاف، ولا سيما التي من المصادر الفطرية [٢٩]. عادةً ما يكون مستحضر الأعلاف-الإنزيم مزيج من الكثير من الإنزيمات يحتوي على الجلوكانيزات، الزيلانيزات، البروتينيزات والأميليزات.

(٤, ٤, ٥) المنسوجات Textiles

إن استخدام الإنزيمات في صناعة الغزل والنسيج هو واحد من أسرع المجالات نمواً في علم الإنزيمات الصناعية. وتستخدم الأميليزات في إدخال المواد الحيوية إلى ألياف المنسوجات. ومجموعة أخرى مهمة من الإنزيمات

المستخدمة في صناعة الغزل والنسيج هي السليوليزات. وبسبب قدرتها على تعديل الألياف السليولوزية ومن ثم تحسين نوعية الأقمشة بطريقة جيدة التحكم، فإن هذه الإنزيمات (المتعادلة أو الحمضية) تقدم بديلاً ممتازاً لأحجار غسيل الملابس الزرقاء. وللقضاء على استخدام أحجار الغسيل الكثير من المزايا، مثل تقليل الضرر على الغسالات والملابس، وتحسين التعامل وتقليل المشكلات البيئية. وتسمح أحجار الغسيل الإنزيمية بما يصل إلى ٥٠٪ أكثر في التحميل وتنتج المظهر المطلوب وليونة الصقل النهائي. والسليوليز المتعادل هو الإنزيم المفضل لأحجار الغسيل؛ بسبب قلة درجة صبغه الرجعية، واتساع مدى قيم الأس الهيدروجيني له. وهذه الخاصية الأخيرة تقلل من الحاجة للتحكم القوي في درجة حموضة الغسيل، مما يؤدي إلى صقل نهائي أكثر تكراراً من غسلة لأخرى.

يعدُّ تكوين الزغب وبروزه من المشكلات الشائعة المرتبطة باستخدام أنسجة القطن أو الأنسجة الطبيعية الأخرى. وتستخدم السليوليزات لهضم نهايات الألياف الصغيرة التي تبرز من النسيج، مما يؤدي إلى صقل نهائي أفضل [٣٩].

في الآونة الأخيرة، تم اختبار فوق أكسيد الهيدروجين كمادة مبيضة للمنسوجات لتحل محل المواد الكيميائية المعتمدة على الكلور، وقد استخدم الكاتاليز لتحليل الزيادة من فوق الأكسيد. وهناك نهج آخر حديث وهو استخدام الإنزيمات المؤكسدة مباشرة لتبييض المنسوجات. واللاكيز-إنزيم مؤكسد عديد الفينولات من الفطريات- هو مرشح جديد في هذا المجال. وهو إنزيم يحتوي على النحاس الذي يتم أكسدته بواسطة الأكسجين. وفي حالة الأكسدة يمكنه أن يحلل الكثير من الأنواع المختلفة من الجزيئات عن طريق أكسدتها، بما في ذلك ألوان الصباغة.

(٥, ٤, ٥) الورق واللب Pulp and Paper

أجريت دراسات مكثفة خلال السنوات العشرين الماضية لاستخدام الكثير من الإنزيمات المختلفة في صناعة اللب والورق. وتستخدم الزيلانيزات في تبييض اللب، حيث تقوم بتحرير أجزاء اللجنين عن طريق تحليل الزيلان المتبقي. وهذا يقلل إلى حدٍ كبيرٍ من الحاجة إلى مواد التبييض الكيميائية المعتمدة على الكلور. وتستخدم السليوليزات في نزع الأحبار من ألياف السليولوز خلال إعادة التدوير.

في صناعة الورق، تستخدم الأميليزات، وبخاصة لتحوير النشا، مما يحسن من قوة، وصلابة، وقابلية المحو للورق. ويجب أن يكون لمعلق النشا درجة لزوجة معينة، والتي تتحقق من خلال إضافة إنزيمات الأميليز في عملية محكومة.

تعدُّ إزالة القار، وهو مادة لزجة مكونة من الدهون توجد أساساً في الأخشاب اللينة، هي مشكلة خاصة عند استخدام اللب الميكانيكي للصنوبر الأحمر كمادة خام. ويمكن إزالته بواسطة الليبيزات.

(٥ , ٤ , ٦) الجلود Leather

تستخدم صناعة الجلود الإنزيمات المحللة للبروتين والدهون في تجهيز الجلود. ويرتبط استخدام هذه الإنزيمات بتركيب جلد الحيوان كمادة خام. تستخدم الإنزيمات لإزالة الأجزاء غير المرغوب فيها. تضاف إنزيمات البروتييز القلوية في مرحلة النقع. وهذا يحسن امتصاص المياه من قبل الجلود الجافة، وإزالة وتحليل البروتينات والأوساخ والدهون، ويقلل من وقت المعالجة. وفي بعض الحالات يستخدم التربسين من البنكرياس في هذه المرحلة.

وتستخدم إنزيمات البروتييز في نزع الشعر والصوف من الجلد، وتحسين جودته (سطح أنظف وأكثر قوة، وجلد أكثر ليونة، وأقل بقع). وتستخدم الليبيزات في هذه المرحلة أو في مرحلة الضرب لإزالة الشحوم بصفة خاصة. واستخدام الليبيزات هو تطور جديد إلى حدٍ ما في صناعة الجلود.

(٥ , ٤ , ٧) الوقود الحيوي من الكتلة الحيوية Biofuel from Biomass

ربما كان استخدام كتلة اللجنوسليولوز الحيوية لإنتاج الوقود الحيوي هو أهم التطبيقات الناشئة للإنزيمات التي يجري حالياً التحقق منها. تمثل الكتلة الحيوية مورداً وفيراً متجدداً متاحاً للبشرية. ولكن يقتصر استخدامها، بسبب عدم وجود تقنية تحويل إنزيمية فعالة التكلفة؛ نتيجة لارتفاع تكلفة السليولوزات وعدم وجود تخصصية لأوساط التفاعل اللجنوسليولوزية المختلفة. والإستراتيجية المستخدمة حالياً في إنتاج الإيثانول الحيوي من الكتلة الحيوية هي عملية متعددة الخطوات تشمل التحلل الإنزيمي كخطوة حاسمة. وفي الجهود المبذولة لتطوير تقنيات فعالة لإنتاج الوقود الحيوي، تم توجيه بحوث مهمة نحو تعريف أنظمة سليوليز فعالة وظروف العملية، إلى جانب الدراسات الموجهة نحو التحسينات الكيموحيوية والوراثية للكائنات الموجودة المستخدمة في العملية [٤٠]. ولا يزال يتعين تقرير إستراتيجيات فعالة والبحث النشط مازال مستمراً في هذا الاتجاه.

(٥ , ٤ , ٨) تطبيقات الإنزيم في قطاعات الكيمياء والدواء

Enzyme Application in the Chemistry and Pharma Sectors

يعدُّ العدد الكبير من المركبات التي يجب اختبارها للنشاط الحيوي لإيجاد مركب واحد واعد مسألة مهمة في قطاع الدواء. وقد تلقى التحفيز الحيوي الاندماجي الكثير من الاهتمام في هذا المجال، حيث إنه يمكن أن يضيف مستوى من التعقد لتنوع المكتبات الكيميائية الموجودة، أو يمكن استخدامه لإنتاج المكتبات الجديدة [٤١]. والمثال على ذلك هو استخدام إنزيمات الجليكوزيل ترانسفيريزات لتغيير نمط ارتباط المركبات الحيوية الفعالة بالجليكوزيل. وعلى الرغم من أن القليل فقط من السلع الكيميائية، مثل الأكريلاميد، يتم إنتاجه بتقنية الإنزيمات (حجم الإنتاج السنوي ٤٠٠٠٠ طن)، فقد أثبت هذا النجاح بأنه يمكن تصعيد تقنية التحويل الحيوي.

ويتم أيضاً إنتاج الكثير من المواد الكيميائية الأخرى، بما في ذلك المركبات الفراغية [٢]، عن طريق التحفيز الحيوي على المستوى متعدد الطن.

(٩ , ٤ , ٥) الإنزيمات التخصصية Specialty Enzymes

بالإضافة إلى تطبيقات الإنزيمات على المستوى الكبير، فإنه يوجد عدد كبير من التطبيقات التخصصية للإنزيمات. وتشمل هذه استخدام الإنزيمات في التطبيقات التحليلية السريرية، وإنتاج النكهات، وتحوير البروتينات، ومنتجات العناية الشخصية، وتقنية الحمض النووي، وإنتاج المواد الكيميائية الدقيقة. وخلافاً لمعظم الإنزيمات الصناعية، يجب أن تكون هذه الإنزيمات خالية من الآثار الجانبية، مما يؤكد الحاجة إلى عمليات تنقية دقيقة.

تستخدم إنزيمات الفوسفاتيز القلوية والبيروكسيديزات في الفحوصات المناعية. وتعدُّ الحساسات الحيوية تطوراً مهماً في الكيمياء التحليلية. والتطبيق الأكثر استخداماً هو الحساس الحيوي للجلوكوز الذي يشمل تفاعل يحفزه إنزيم الجلوكوز أوكسيديز:

$$\text{glucose} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{gluconic acid} + H_2O_2$$

جلوكوز + أوكسجين + ماء ← حمض الجلوكونيك + فوق أكسيد الهيدروجين

وتتوفر الكثير من الأجهزة التجارية التي تطبق هذا المبدأ لقياس الجزيئات مثل الجلوكوز، واللاكتات، واللاكتوز، والسكروز، والإيثانول، والميثانول، والكولسترول، وبعض الأحماض الأمينية.

(١٠ , ٤ , ٥) الإنزيمات في منتجات العناية الشخصية Enzymes in Personal Care Products

يعدُّ هذا مجال جديد نسبياً للإنزيمات، وتكون الكميات المستخدمة صغيرة، لكنه جدير بالذكر كمنطقة نمو مستقبلية. وأحد التطبيقات هو تنظيف العدسات اللاصقة. وتستخدم محاليل إنزيمية تحتوي على البروتينيز والليبيز لهذا الغرض. ويستخدم فوق أكسيد الهيدروجين في تطهير العدسات اللاصقة، ويمكن إزالة فوق أكسيد الهيدروجين المتبقي بعد التطهير بواسطة إنزيم كاتليز يحتوي على الهيم.

وتستخدم إنزيمات الجلوكوأميليز والجلوكوأوكسيديز في بعض معاجين الأسنان، حيث يحرر الجلوكوأميليز الجلوكوز من السكريات المعتمدة على النشا الناتجة بواسطة الألفا-أميليز، ويحول الجلوكوأوكسيديز الجلوكوز إلى حمض الجلوكونيك وفوق أكسيد الهيدروجين، ويعمل كلٍ منهما كمطهر. ويمكن تنظيف أطقم الأسنان بمحاليل إنزيمية لتحليل البروتين. كما تم أيضاً دراسة إنزيمات مثل الكيتينيز للتطبيقات في منتجات العناية بالبشرة والشعر.

(١١ , ٤ , ٥) الإنزيمات في تقنية الحمض النووي Enzymes in DNA Technology

تؤدي الإنزيمات المعدلة للحمض النووي دوراً حاسماً في تقنية الحمض النووي التي أحدثت ثورة في التقنية الحيوية التقليدية وكذلك الحديثة. ويمكن تقسيمها إلى فئتين:

- إنزيمات التقييد: تتعرف هذه الإنزيمات على تسلسلات معينة من الحمض النووي وتقطع سلسلة الحمض في مواقع التعرف.
- الإنزيمات المعدلة للحمض النووي: تخلق هذه الإنزيمات الأحماض النووية، وتحللها، وتربط قطعها معاً، وتزيل أجزاء من الحمض النووي.

وتنتج إنزيمات التقييد انقسام بعد التعرف على رمز تسلسل معين في الحمض النووي. وهي ضرورية في تقنية الجينات. وتخلق إنزيمات بلمرة الحمض النووي سلاسل الحمض النووي الجديد باستخدام قالب أو نموذج يتم نسخه. وتحلل إنزيمات النيوكلييزات روابط الفوسفات ثنائية الإستر بين سكريات الحمض النووي. وتضيف إنزيمات الكاينيزات مجموعات الفوسفات، وتزيلها إنزيمات الفوسفاتيزات من نهاية سلسلة الحمض النووي. وتضم إنزيمات الليجيزات النيوكليوتيدات المجاورة معاً من خلال تكوين روابط الفوسفات ثنائية الإستر بينها.

وتشارك الإنزيمات داخل الخلية في تضاعف الحمض النووي، وتحليل الحمض النووي الخارجي، وإصلاح طفرات الحمض النووي، وإعادة ربط جزيئات الحمض النووي المختلفة. ويتم إنتاج هذه الإنزيمات المستخدمة في تقنية الجينات مثل أي إنزيم آخر، ولكن تحتاج تنقيتها إلى عناية إضافية.

(٥ , ٥) الاستنتاجات Conclusions

لقد استخدمت الإنزيمات على نطاقٍ واسع لتحسين البيئة، ولحماية مواردنا، ولخلق فرص جديدة. لا يكاد يكون هناك أي منطقة بمنأى عن الإنزيمات. وقد نمت السوق العالمية للإنزيمات التجارية بشكلٍ مطرد نتيجة لتحسن كفاءة الإنتاج وكذلك عمليات المعالجة النهائية، مما أعطى إنزيمات أرخص وأكثر فعالية. وهي تستخدم على نطاقٍ واسع في الصناعة كما نوقش بالتفصيل في الفصل، ومازال هناك مجال للتحسين. وهذا يؤكد على ضرورة مواصلة الجهود لاكتشاف إنزيمات جديدة ذات خصائص جديدة من البيئات الغريبة من خلال برامج الفرز.

وبوضوح، سوف يتم استخدام الإنزيمات على نطاقٍ واسع في المستقبل، وهذا سوف ينعكس على عدد الإنزيمات المتوافرة على النطاق الصناعي والبحثي، تنوع التفاعلات التي يتم تحفيزها، والظروف البيئية التي تعمل

تحتها. وعلى وجه الخصوص، من المتوقع ظهور تطبيقات جديدة في مجال منتجات العناية الشخصية، ويمكن توقع تقدم مفاجئ فـي المعرفة في الجيل الثاني لإنتاج الوقود الحيوي من الكتلة الحيوية، حيث تؤدي السليوليزات دوراً رئيساً في تحويل الكتلة الحيوية إلى السكريات والتي يتم بعد ذلك تخميرها إلى الإيثانول. ومن المرجح أن تعطي زيادة الضغوط البيئية وارتفاع أسعار الطاقة هذا التطبيق أهمية حقيقية.

وتقنية الإنزيمات الصناعية هي مـجال للبحوث الجارية النشطة يمر بمرحلة النضج، فضلاً عن التطور. ويوحي الفهم الأفضل للإنزيمات المكتشفة سابقاً وأهميتها الوظيفية بأن هناك الكثير من التطبيقات الجديدة لأنشطتها الحفزية. وسوف يتم طرح الإنزيمات المعروفة للاستخدامات الجديدة، واستخدام الإنزيمات الجديدة، المكتشفة داخل محاريبها الحيوية أو المنتجة باستخدام هندسة تصميم الإنزيم، لتحفيز التفاعلات غير المستغلة حتى الآن. وهذا هو مـجرد بداية عصر تقنية الإنزيمات. ومن المتوقع أن تحل أدوات التطور الموجه وتقنيات الحيوية الجزيئية مقرونةً بتطوير طرق فرز واختيار قوية وعالية الإنتاجية المشكلات الصعبة فـي مجال هندسة البروتين والهندسة الأيضية في السنوات المقبلة.

المراجع References

[١] Burton, S.G., Cowan, D.A., and Woodley, J.M. (2002) The search for the ideal biocatalyst. *Nat. Biotechnol.*, **20,** 37–45.

[٢] Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A., and Reetz, M.T. (2001) Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55,** 519–530.

[٣] Powell, K.A., Ramer, S.W., del Cardayre, B., Stemmer, W.P.C., Tobin, M.B., Longchamp, P.F., and Huisman, G.W. (2001) Directed evolution and biocatalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40,** 3948–3959.

[٤] Farinas, E.T., Bulter, T., and Arnold, F.H. (2001) Directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12,** 545–551.

[٥] Wahler, D. and Reymond, J.L. (2001) High-throughput screening for biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12,** 535–544.

[٦] Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., and Golyshin, P.N. (2007) Mining enzymes from extreme environments. *Curr. Opin. Microbiol.*, **10,** 207–214.

[٧] Bruins, M.E., Janssen, A.E., and Boom, R.M. (2001) Thermozymes and their applications: a review of recent literature and patents. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **90,** 155–186.

[٨] Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L. (2001) Life in extreme environments. *Nature*, **409,** 1092–1101.

[٩] Breithaupt, H. (2001) The hunt for living gold: the search for organisms in extreme environments yields useful enzymes for industry. *EMBO Rep.*, **2,** 968–971.

[١٠] Demirijan, D., Morris-Varas, F., and Cassidy, C. (2001) Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5,** 144–151.

[١١] Pandey, A. (1992) Recent process developments in solid-state fermentation . *Process Biochem.*, **27,** 109–117.

[١٢] Pandey, A. (1994) Solid-state fermentation, in *Solid-State Fermentation* (ed. A. Pandey), Wiley Eastern Limited, New Age International, New Delhi, India 2, pp. 3–10.

[١٣] Pandey, A. (2003) Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **13,** 81–84.

[١٤] Pandey, A. and Soccol, C.R. (1998) Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosic bioconversion in solid-state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **41,** 379–390.

obeikandl.com

[١٥] Pandey, A. and Soccol, C.R. (2000) Economic utilization of crop residues for value addition–A futuristic approach. *J. Sci. Ind. Res.*, **59,** 12–22.

[١٦] Pandey, A., Soccol, C.R., and Mitchell, A. (2000) New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.*, **35,** 1153–1169.

[١٧] Pandey, A., Soccol, C.R., and Larroche, C. (eds) (2007) *Current Developments in Solid-State Fermentation*, Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India, p. 517.

[١٨] Hölker, U., Höfer, M., and Lenz, J. (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64,** 175–186.

[١٩] Rodr ı guez Couto, S. and Sanroman, M.A. (2005) Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem. Eng J.*, **22,** 211–219.

[٢٠] Couri, S., Merces, E.P., Neves, B.C.V., and Senna, L.F. (2006) Digital image processing as a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results. *J. Microsc.*, **224** (3), 290–297.

[٢١] Pandey, A., Soccol, C.R., and Larroche, C. (2007) Introduction, in *Current Developments in Solid-State Fermentation* (eds A. Pandey, C.R. Soccol, and C. Larroche), Springer Science, New York and Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, pp. 3–12.

[٢٢] Pandey, A., Soccol, C.R., and Larroche, C. (2007) General consideration about solid-state fermentation processes, in *Current Developments in Solid-State Fermentation* (eds A. Pandey, C.R. Soccol, and C. Larroche), Springer Science, New York and Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, pp. 13–25.

[٢٣] Tengerdy, R.P. (1998) Solid substrate fermentation for enzyme production, in *Advances in Biotechnology* (ed. A. Pandey), Educational Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13–16.

[٢٤] Tengerdy, R.P. (1996) Cellulase production by solid state fermentation. *J. Sci. Res.*, **55,** 313–316.

[٢٥] Pandey, A., Selvakumar, P., Nigam, P., and Soccol, C.R. (1999) Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, **77** (1), 149–162.

[٢٦] Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Kriger, N., and Soccol, V.T. (1999) The Realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29** (2), 119–131.

[٢٧] Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Krieger, N., and Fontana, J.D. (1999) Recent developments in microbial inulinases-Its production, properties and industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **81** (1), 35–52.

[٢٨] Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Singh, D., Soccol, V.T., and Mohan, R. (2000) Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **31,** 135–152.

[٢٩] Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., and Soccol, V.T. (2001) Production, purifi cation and properties of microbial phytases. *Bioresour. Technol.*, **77** (3), 203–214.

[٣٠] Pandey, A., Larroche, C., and Soccol, C.R. (Guest eds) (2006) Food enzymes and additives, part 1: enzymes and organic acids for food applications. Special Issue of *Food Technol. Biotechnol.*, **44** (2), 123–300.

[٣١] Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., and Larroche, C. (eds) (2006) *Enzyme Technology*, Springer Science, New York, p. 740.

[٣٢] Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Napoothiri, K.M., Soccol, C.R., and Pandey, A. (2006) Alpha amylase from microbial sources-an overview on recent developments. *Food Technol. Biotechnol.*, **44** (2), 173–184.

[٣٣] Sumantha, A., Larroche, C., and Pandey, A. (2006) Microbiology and industrial biotechnology of food grade proteases a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, **44**(2), 211–220.

[٣٤] Pandey, A. and Ramachandran, S. (2005) Process developments in solid-state fermentation for food applications, in *Food Biotechnology*, 2nd edn (eds K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto, and R.E. Levin), Taylor and Francis, New York, pp. 87–110.

[٣٥] Imamglu, S. (2002) Stimulated moving bed chromatography for application in bioseparation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **76,** 211–231.

[٣٦] Shu-Jen, C. (2004) Strain improvement for fermentation and biocatalysis processes by genetic engineering technology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **31,** 99–108.

[٣٧] Olempska-Beer, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., and DiNovi, M.J. (2006) Food-processing enzymes from recombinant microorganisms–a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **45,** 144–158.

[٣٨] Fenel, F., Leisola, M., Janis, J., and Turunen, O. (2004) A de novo designed N-terminal disulphide bridge stabilizes the. *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II. *J. Biotechnol.*, **108** (2), 137–143.

[٣٩] Cavaco-paulo, A. (1997) Cellulases in the textile industry–an overview. *Carbohydr. Polym.*, **34,** 4.

[٤٠] Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., and Pandey, A. (2006) Microbial cellulases-Production, applications and challenges. *J. Sci. Ind. Res.*, **64,** 832–844.

[٤١] Rich, J.O., Michels, P.C., and Khmelnitsky, Y.L. (2002) Combinatorial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6,** 161–167.

obeikandl.com

الفصل السادس

التحفيز الحيوي التطبيقي: نظرةٌ عامة

APPLIED BIOCATALYSIS: AN OVERVIEW

بيدرو فيرناندیز و يواخيم كابرال

Pedro Fernandes and Joaquim M.S. Cabral

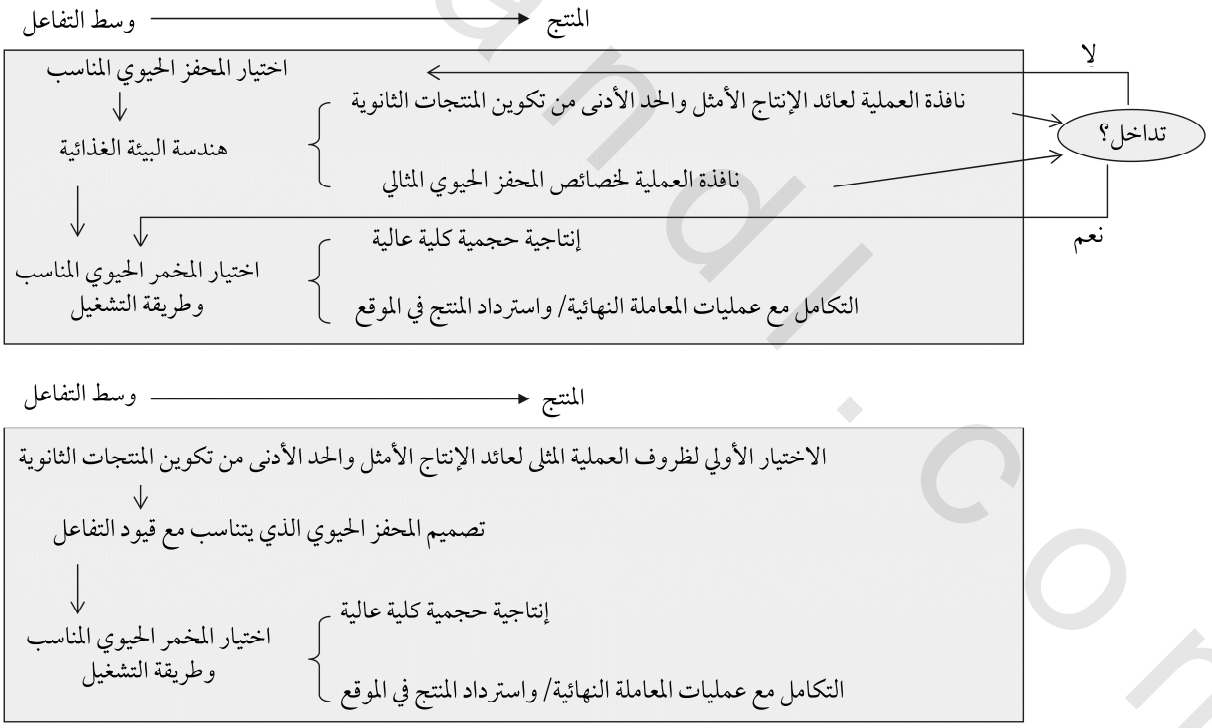
(١ , ٦) المقدمة Introduction

يستند مفهوم التحفيز الحيوي التطبيقي على استخدام محفز حيوي لتحفيز التحول الكيميائي لوسط تفاعل معين إلى الناتج، بطريقة انتقاء كيميائية/ اتجاهية/ فراغية، تحت ظروف معتدلة ومحكومة [١]. ويمكن أن يكون المحفز الحيوي إما إنزيم معزول وإما خلية كاملة تحتوي على الإنزيمات المطلوبة. ووفقاً لطبيعة المحفز الحيوي، فإن التحول عادةً ما يوصف بأنه تحفيز حيوي أو تحويل حيوي [٢]. وخلال النص بأكمله سيتم استخدام مصطلح "التحويل الحيوي" الواسع لتعيين أي من هذه التحويلات، إلا إذا كانت هناك حاجة للتخصيص في هذا السياق.

في الوقت الراهن تستخدم الإنزيمات المعزولة والخلايا الكاملة، في صورة حرة أو مقيدة، في إنتاج وتصنيع مجموعة كبيرة من المركبات والبضائع، كما تمت مناقشته بالتفصيل في فصولٍ مختلفة من هذا الكتاب. تستخدم المحفزات الحيوية على نطاقٍ واسع في إنتاج السلع والكيماويات الدقيقة، ومنتجات العناية بالمستهلك والمستحضرات الصيدلانية الحيوية؛ وفي تطوير تطبيقات التحليل والتشخيص؛ وفي التحليل الحيوي للمركبات الضارة أو النفايات؛ وفي قطاع الطاقة؛ وفي ترميم الأعمال الفنية التالفة [٣-٩]. وعلى الرغم من هذا الانتشار الواسع، فإنه لابد من الإشارة إلى أن مهمة تطوير، وتحسين، وتنفيذ نظام تحويل حيوي فعال ليست مهمة سهلة، حيث إنه لابد من النظر في عدة جوانب بعناية. فاختيار المحفز الحيوي، وطبيعته وتركيبه، وخصائص بيئة التحويل الحيوي، وتركيب المفاعل الأكثر أفضلية هي خصائص يجب التحقق منها، وتكون علاوةً على ذلك مترابطة.

بعد تحديد خطوة/ مسار التحفيز، فإن النهج التقليدي لتطوير نظام تحويل حيوي معين يركز على خصائص المحفز الحيوي؛ لأنها سوف تعمل في ظل ظروف تشغيلية صارمة ويمكن أن تكون تكلفتها جزء مهم من

التكاليف الكلية للعملية [١٠]، على الرغم من المبالغة في كثيرٍ من الأحيان لهذه الخاصية الأخيرة [١، ١١]. وعلاوةً على ذلك، فالتحسينات الأخيرة في إنتاج المحفز الحيوي [١٢، ١٣]، جنباً إلى جنبٍ مع زيادة تكاليف المواد الخام، تميل إلى تقليل أهمية المحفزات الحيوية في تكاليف العملية [١٠]. ومن ناحيةٍ أخرى، فإن فهمنا المتزايد لتركيب الإنزيم وآليات التفاعل [١٤]، إلى جانب طرق التطوير السريع لمحفزات حيوية ذات خصائص محسنة (على سبيل المثال، النشاط، والتخصصية، والاستقرار، لا سيما تحت ظروف تفاعل غير تقليدية)، والإنجذاب إلى أوساط التفاعل الغير عادية [١٥]، وكذلك طرق الفحص عالية الإنتاجية التي تسمح بتعريف المحفزات الحيوية الجديدة/ المحسنة و/ أو الأنشطة التحفيزية الجديدة [١٦، ١٧]، قد ساهمت جميعاً في توسيع أوساط التفاعل المستهدفة بالتحفيز الحيوي. وسمحت أيضاً بتركيزات مرتفعة من وسط التفاعل وعليه زيادة الإنتاجية، ومهدت الطريق لتحول في النهج التقليدي. وهذا يعني، إجبار المحفز الحيوي ليناسب نظام تحفيز حيوي تم تصميمه حول التفاعل، مع الأخذ في الاعتبار الديناميكا الحرارية للتفاعل وخصائص وسط التفاعل والمنتجات (الشكل رقم ١, ٦) [١٠].



الشكل رقم (١, ٦). لمحة موجزة عن الخطوات الرئيسة التي ينبغي النظر فيها عند تصميم نظام التحويل الحيوي. النهج التقليدي (أ) يركز على خصائص المحفز الحيوي، في حين أن النموذج الناشئ الجديدة (ب)، المتصور منذ البداية، يعتمد على قيود التفاعل. مقتبس من [١٠، ١٨، ١٩].

يتطلب تنفيذ مثل هذه النقلة النوعية مزيجاً من تقنيات عديدة، مع التكاليف المترتبة على المدى القصير، ولكن من المحتمل أن تكون العائدات مجزية على المدى المتوسط والبعيد. وينبغي أيضاً تصميم نظام التحول الحيوي لتسهيل استرجاع المنتج، من خلال استرداد المنتج في الموقع مباشرة، إما من خلال نقلٍ مستمرٍ للمنتج إلى مرحلةٍ ثانية سائلة أو صلبة [٢٠-٢٢]، أو من خلال تكوين مرحلة صلبة ثانية [٢٣]. وهناك اعتبارات خاصة مطلوبة أيضاً إذا كانت خطوة التحفيز الحيوي هي جزء من مسار يتضمن أيضاً التحفيز الكيميائي. ويكون المزج بين التحفيز الكيميائي والإنزيمي جذاباً بشكلٍ خاص في تخليق البوليمرات، حيث إن المواد الخام غالباً ما تكون مركبات ذات عدة مجموعات وظيفية عضوية متشابهة، والتي يميزها الإنزيم بسهولة لطبيعة انتقائه الفراغية، على العكس من المحفز الكيميائي الذي يتطلب استخدامه حماية وعدم حماية كل هذه المجموعات عدا المجموعة المستهدفة للتغيير. يمكن بلمرة الوحدات البنائية بواسطة التحفيز الكيميائي بسرعة أكبر من النهج الإنزيمي [١٥، ٢٤]. وقد استخدم الجمع بين النهجين في تخليق البوليمرات القائمة على السكر [٢٥]، والببتيدات [٢٦، ٢٧]، والنيوكليوتيدات الديوكسي ريبوزية [٢٨]، وأحماض البيتا الأمينية [٢٩]، والعقاقير المساعدة البوليمرية من البروفينات [٣٠].

(٦, ٢) تصميم نظام التحويل الحيوي The Design of the Bioconversion System

(٦, ٢, ١) المحفز الحيوي The Biocatalyst

(٦, ٢, ١, ١) الاختيار Selection

عند اختيار محفز حيوي مناسب لتحويل حيوي معين، يجب أخذ الكثير من الخصائص بعين الاعتبار. وهذه تشمل النشاط، والانتقائية، والاستقرار في العمل تحت ظروف التشغيل المطلوبة (درجة الحموضة، ودرجة الحرارة، وتركيب البيئة، ووسط التفاعل، وتركيزات المنتج). ويمكن اتخاذ عدة مناهج في اختيار المحفز الحيوي للتحويل الحيوي المقصود، أي استخدام المحفز الحيوي القائم، والتعديل الوراثي للمحفز الحيوي القائم أو الكشف عن المحفزات الحيوية الجديدة [١٩، ٣١]. والتصفح خلال المراجع هو النهج الشائع لاختيار محفز حيوي قائم. ويمكن استكمال هذا العملية التقليدية بالمعلومات التي تم جمعها من قواعد بيانات مثل بريندا (http://www.brenda.uni-koeln.de)، التي تعطي تقييم سهل للتفاصيل عن الإنزيمات الموجودة، مثل أوساط التفاعل الطبيعية والمنتجات، والعوامل المساعدة، والمسارات، والمثبطات. وقد يسهم هذا بشكلٍ ملحوظ في الإسراع في الاختيار. وقد أضيفت حديثاً بيانات استخراج النص (AMENDA and FRENDA) إلى المخزون.

وينبغي أن يؤخذ في الاعتبار أن استخدام الإنزيمات الموجودة تحت ظروف تفاعل غير عادية قد يكشف نشاطات حفزية حيوية غير مستغلة. وهذا يمكن أيضاً تحقيقه من خلال التعديل الوراثي للمحفزات الحيوية

القائمة عن طريق التطفيرات موجهة-المكان أو التطفيرات العشوائية. ويمكن أيضاً إجراء هذه التعديلات لزيادة النشاط و/ أو الاستقرار و/ أو الانتقائية.

ويأخذ النهج الثالث للكشف عن المحفز الحيوي وهو التصفح عن الكائنات الدقيقة ذات أنشطة جديدة في الاعتبار التنوع الكيميائي الحيوي الكبير في الطبيعة. وينبغي الإشارة إلى أن هذا النهج لا يزال بعيداً عن الاستغلال الكامل، حيث إن أقل من ١٠٪ من الكائنات الدقيقة (مثل البكتيريا) الموجودة في بيئة معينة يمكن زراعتها في بيئات قياسية [٣٢]. وقد أدى تطور التقنيات التي تسمح بالكشف عن أعداد كبيرة من الكائنات الحية من خلال طرق كشف بسيطة ورخيصة، وسريعة، وانتقائية، مع الأتمتة، وإلى تحسن هذه العملية الشاقة عادة.

(٦,٢,١,٢) خلايا كاملة أو إنزيمات معزولة؟ Whole Cells or Isolated Enzymes?

ينصح باستخدام إنزيم معزول لتحفيز تفاعل من خطوة واحدة، شريطة أن يكون العزل واضحاً ورخيصاً والإنزيم الناتج يكون مستقراً في بيئة خالية من الخلايا. وتشير التقديرات إلى أنه لكي تكون هذه الطريقة قادرة على المنافسة مع عمليات الخلايا الكاملة يجب أن لا تتعدى تكلفة الإنزيم ٥-١٠٪ من التكلفة الإجمالية للمنتج [١٨]. وقد استخدم عدد من الإنزيمات المعزولة في صورة نقية (جزئياً) في نظم التحويل الحيوي، مثل الألكحول ديهيدروجينيزات، الألدوليزات، الأميليزات، الأميلوجليكوزيدات، الكاتاليزات، السليوليزات، البيتا-جالاكتوزيدات (وتشمل اللاكتيزات)، مصاوغات الجلوكوز، مؤكسدات الجلوكوز، الإنيولينيزات، الكيتوليزات، اللاكيزات، الليبيزات، البكتينيزات، البوللليولانيز المحلل لإسترات ميثيل البكتين، الأسيليزات للبنيسيلين ج، الفسوسفوليبيزات، والتريبسينات [١٩، ٣٣]. وقد تكون إزالة الإنزيم من بيئته الطبيعية، مع ذلك، معقدة ومكلفة، وقد يكون الإنزيم المعزول أقل استقراراً و/ أو يفقد النشاط التحفيزي. ويلاحظ في كثيرٍ من الأحيان فقدان النشاط التحفيزي عند استخدام الإنزيمات المرتبطة بالغشاء (مثل الأوكسيجينيزات المحتوية على الحديد، مثل السيتوكروم P450s وهيدروكسيلاز الألكان) [٣٤، ٣٥].

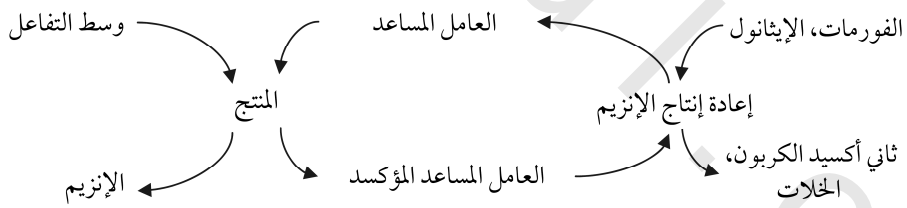
وقد تجعل تفاعلات الأكسدة-والاختزال، والتي تحتاج عوامل مساعدة مثل الأسيتيل Co-A، ATP، FAD، ونيوكليوتيدات السكر أو ٣'-فوسفوأدينوزين-٥'-فوسفوسلفات (PAPS)، أيضاً استخدام الخلايا الكاملة كمحفزات حيوية جذاباً، حيث إن العوامل المساعدة مكلفة وتتطلب التوفير المستمر لجعل نظام التحويل الحيوي مجدياً اقتصادياً. ويعدُّ استخدام الخلايا الكاملة بمساعدة مصدر كربوني يوفر طاقة الحفظ للخلية، وكذلك القدرة الاختزالية لتوفير العوامل المساعدة [١]، أكثر فعالية من حيث التكلفة، على الرغم من أنها قد تؤدي إلى تكوين نواتج ثانوية وتعرقل استرداد المنتج [٣٦]. وقد اقترحت عدة أساليب كيميائية، وكيميائية-كهربائية،

وكيميائية-إنزيمية، وإنزيمية للسماح باستخدام الإنزيمات في نظم التحويل الحيوي ذات تفاعلات الأكسدة والاختزال [٣٧، ٣٨].

ولكي تكون مفيدة وعملية، فإن جميع هذه الطرق تحتاج إلى الامتثال لبعض الاحتياجات اللازمة لتوفير العوامل المساعدة [٣٧]:

- ينبغي أن يكون عدد التحول الكلي للعامل المساعد (المعرف بالعدد الكلي لمولات المنتج الناتجة من مول من العامل المساعد خلال وقت التفاعل الكامل) عالياً (على الأقل من ١٠ ٣-١٠ ٥).
- يجب أن تكون جميع المواد المستخدمة (الإنزيمات والكواشف) متاحة بسهولة ويمكن الوصول إليها، ورخيصة نسبياً ومستقرة تحت ظروف التشغيل، ولا ينبغي أن تتداخل مع نظام التفاعل الرئيس جنباً إلى جنبٍ مع المنتجات الثانوية لخطوة التجديد.
- ينبغي أن تكون خطوة التجديد ملائمة حركياً وحرارياً.

وتفضل الطرق الإنزيمية المعتمدة على تفاعل مزدوج (الشكل رقم ٦,٢) حالياً لتوفير العوامل المساعدة، نظراً؛ لأنها توفر أفضل ملائم لتلك المتطلبات، على الرغم من أن الطرق الكيميائية-الإنزيمية، المعتمدة على استخدام المحفزات الكيميائية، مثل المتراكب الفلزي العضوي الروديوم (٢،٢'-ثنائي البيريديل)(خماسي الميثيل خماسي الداينيل الحلقي) [٣٩] وسيبولكرات الزنك/ كوبالت الثلاثي [٣٨] تبدو واعدة لتوفير العوامل المساعدة.



الشكل رقم (٦,٢). تخطيط لنظام تحفيز حيوي ذي تجديد إنزيمي للعوامل المساعدة. إنزيمات التجديد الشائعة مثل الألكحول ديهيردوجينيز (ADH)، الفورمات ديهيردوجينيز (FDH)، الجلوكوز ديهيردوجينيز (GDH).

مقارنةً مع الإنزيمات المعزولة، فإن محفزات الخلية الكاملة عادةً ما تكون أسرع وأرخص، وحيث إن الإنزيمات محمية من البيئة الخارجية، فإنها من المرجح أن تكون أكثر استقراراً على المدى الطويل. فمن جهة، في نظام الخلية الكاملة توجد عدة إنزيمات، بالإضافة إلى الإنزيم المطلوب، وهي الميزة التي من المرجح أن تؤدي إلى تكوين نواتج ثانوية. ويمكن تصور المعالجة الحرارية للخلايا للقضاء على النشاط الإنزيمي غير المرغوب فيه، شريطة أن يتحمل الإنزيم المطلوب المعالجة [٤٠-٤٢]. وتشمل البدائل الأخرى لتفادي النشاط الإنزيمي غير المرغوب فيه

استخدام خلايا مجفدة [٤٣]. ومع ذلك، إذا لم يكن لتلك الإنزيمات الإضافية أي تأثير على نقاء المنتج والإنتاجية، فإنه يفضل استخدام الخلايا الكاملة للتكلفة ومسائل التبسيط المذكورة آنفاً.

من الناحية الأخرى، يميل التحويل الحيوي باستخدام الخلايا الكاملة إلى إظهار معدلات تحويل أقل من الإنزيمات الحرة، تقريباً بعامل واحد أو اثنين من حيث الحجم؛ بسبب قيود انتقال الكتلة الناجمة عن جدران الخلايا والأغشية الخلوية، والتي تعمل بمثابة حواجز مادية وعليه تقلل نفاذية وسط التفاعل (والناتج) [٤٤-٤٨]. وقد تغير قيود انتقال الكتلة هذه أهمية محاولات الكشف لتعريف المحفزات الحيوية للخلايا الكاملة، حيث إن بعضها قد توصف بأنها غير نشطة إذا لم يتم الكشف عن التفاعل في الوقت المناسب، على الرغم من أن الخلية لديها الإنزيمات النشطة. وقد يتم إجراء تنفيذ الخلية (تعديل الجدار الخلوي) للتغلب على قيود انتقال الكتلة هذه. ويمكن استخدام عدة مناهج لتغيير تركيب جدار الخلية أو الغشاء بدون التأثير على المحفز الحيوي. وتعتمد الأساليب التقليدية على الطرق الفيزيائية-الكيميائية مثل [٢٠، ٤٧]:

- التجفيف بالحرارة.
- التجفيف بالأسيتون.
- الدورات المتكررة من التجميد والإذابة.
- الصوتنة (التأثير بالموجات الصوتية).
- إضافة المنظفات (بروميد السيتيل ميثيل أمونيوم، بلورونيك ف-٦٨، تريتون إكس-١٠٠).
- التحضين مع المذيبات العضوية (كلوروفورم، إثيل الإثير الثنائي، سلفوكسيد ثنائي الميثيل، الكحولات قصيرة السلسلة، التولوين).
- الإجهاد بكلوريد الصوديوم.

عند إجراء التحويل الحيوي بواسطة الخلايا النامية، فإنه يمكن إجراء تنفيذ الخلية بالتأثير في بيئة النمو من خلال إضافة مركبات تتداخل مع آليات تكوين جدار الخلية أو تشكيل الغشاء. ومن الأمثلة على ذلك استخدام الجليسين، أيزونيازيد، دي-إل-نورليوسين، وميتا-فلوروفينيل آلانين، أو الكاتيونات الكثيرة مثل البروتامين، البوليميكسين ب نونابتيد، والبولي إيثيلين أمين [٤٩-٥١].

وتنتشر هذه الإستراتيجيات للحد من قيود انتقال الكتلة بشكلٍ جيد، ولكن تم تطويرها بطريقة المحاولة والخطأ، وإضافة الكثير من الخطوات إلى العمليات الحيوية، ولكن يمكن عرقلة النشاط التحفيزي الحيوي المطلوب. وكذلك من المحتمل أن تسبب عوامل تنفيذ الخلية صعوبات في المعاملة النهائية.

ويستند نهج مختلف إلى استخدام تكنولوجيا الحمض النووي المؤتلف لتغير نفاذية الخلية بطريقة يمكن التنبؤ بها من خلال استحداث الطفرات في البروتينات المشتركة في تخليق جدر الخلايا أو الأغشية [٤٧، ٤٨، ٥٢]. وأمكن أيضاً باستخدام الهندسة الجزيئية تقليل تأثير حاجز النفاذية عن طريق تعبير إنزيم داخل الخلية غير متشابه في الحيز قبل البلازميدي في بكتيريا سالبة لصبغة الجرام [٥٣].

وعند الحاجة إلى تحويلات حيوية متعددة الخطوات تشمل مجموعات من التفاعلات الإنزيمية، على سبيل المثال في إنتاج جزيئات كبيرة ومعقدة، فإن الخلايا الكاملة هي بالتأكيد الخيار المفضل حيث إن هذه التفاعلات معقدة لأدائها في المختبر [١٥، ٢٨، ٣٤]. بعض الأمثلة على التحويلات الحيوية متعددة الخطوات تشمل انشقاق السلسلة الجانبية للإستيرول لإنتاج مركبات الستيرويدات الوسيطة، وإنتاج إل-ميثيونين من الهيدانتوين، وإنتاج ٢' -ديؤكسي ريبونيكليوزيدات، وتخليق الكاروتينويدات. والعمليات الإنزيمية حرة-الخلية نادرة نسبياً، ويقتصر استخدام نظم تحفيز حيوي من هذا القبيل على ارتباط اثنين من الإنزيمات [٥٤، ٥٥].

ويمكن زيادة إمكانات نظم التحويل الحيوية المستندة على الخلايا الكاملة من خلال استخدام الهندسة الأيضية والتطور الموجه. ويسمح التحليل الكمي لتنظيم الأيض بالتعرف على النقاط الحرجة في مسارات الأيض، وهذا يمهد الطريق للتغييرات الوراثية، والتي تستهدف تحسين المسارات الطبيعية. وعلاوةً على ذلك، يمكن تعديل المسارات الموجودة لإنتاج مركبات جديدة ويمكن سحب المسارات معاً [١٥]، ومن ثم خلق حقل غير محدود تقريباً للتحفيز الحيوي التطبيقي.

(٦, ٢, ١, ٣) تقييد المحفزات الحيوية Immobilization of Biocatalysts

تعتمد البحوث الأساسية في توصيف خصائص المحفز الحيوي والتحويل الحيوي على استخدام المحفزات الحيوية الحرة معلقة أو مذابة في مرحلة سائلة. وعندما يتم التأسيس، يتم السعي بعد ذلك عادة لتقييد المحفز الحيوي، ولكن في الحالات الخاصة التي تتطلب محفز حيوي حر، كما في صياغة المنظفات (مساحيق الغسيل)، وصناعة الخبز والجبن. وبعض المزايا الفعلية على مستوى العملية الناتجة من تقييد المحفز الحيوي في نظام التحويل الحيوي يمكن توقعها بسهولة. ويسهل عدم تجانس نظام التحفيز الحيوي المقيد من استرداد المحفز الحيوي والمنتج، ويتيح إعادة الاستخدام المتعدد للمحفز الحيوي، والطريقة المستمرة للعملية، والمدى الواسع من المفاعلات الحيوية. يوفر التقييد بيئة وقائية للمحفز الحيوي؛ كما أنه أيضاً، في الحالة الخاصة للإنزيمات، قد يحاكي إلى حدٍ ما طريقة وجودها الطبيعية في الخلايا، حيث ترتبط الإنزيمات في كثيرٍ من الأحيان بالأغشية الخلوية. وعليه يمكن أن يسبب التقييد استقرار تركيب الإنزيمات، ونشاطها الحفزي. وإلى جانب هذه المزايا، تم تسجيل بعض السلبيات الناتجة من التقييد، كالملخصة في الجدول رقم (١, ٦).

الجدول رقم (١ ,٦). مميزات وسلبيات تقييد المحفزات الحيوية.

		التأثيرات الرئيسة/ خصائص معينة
المميزات	المحفز الحيوي مقيد في المفاعل	إعادة استخدام المحفز الحيوي، طريقة تشغيل مستمرة، تجنب تلوث المنتج بالمحفز الحيوي وتسهيل استرجاع المنتج من داخل الخلية
	تعريف البيئة الدقيقة للمحفز الحيوي	إمكانية تصميم النشاط والتخصصية للمحفز الحيوي، استقرار المحفز الحيوي، حماية المحفزات الحيوية الحساسة للإجهاد وتقليل التثبيط البيني
	تركيز عالي من الحفز الحيوي	زيادة معدلات التفاعل، إنتاجية حجمية عالية
السلبيات/ المعوقات	طرق تجريبية	تتطلب وقت زائد، عملية تعتمد على الحالة، تصميم وتحكم معقد
	تكلفة عالية	تحتاج إلى مواد إضافية، معدات، وقت
	فقد لنشاط المحفز الحيوي خلال عملية التقييد	التعرض لدرجات أس هيدروجيني متطرفة، درجات حرارة عالية، إجهاد عالي، أو إجهاد ميكانيكي، مركبات سامة، قيود انتقال الكتلة، إعاقة/منع موضع النشاط وإضعاف وصول مركبات وسائط التفاعل الكبيرة، تغيير درجة الأس الهيدروجيني للبيئة الدقيقة
	فقد لنشاط المحفز الحيوي خلال عملية التقييد	فقد المحفز الحيوي بسبب التسرب أو عدم الإمتزاز؛ تآكل الجسيمات، الذوبان، التمزق بسبب نمو الخلايا؛ فقد الدقائق (الجسيمات ذات قطر أقل من ٥٠-١٠٠ ميكروميتر) في التدفق الخارج؛ تراكم المثبطات/ الملوثات في البيئة الدقيقة
	عوائق تشغيلية	قد تكون هناك حاجة إلى خصائص معينة للمفاعل، تراكم المعلقات الصلبة، التحكم في تركيب المحاليل المغذية

بتصرف من [١٩، ٥٦].

يمكن إجراء التقييد بطرقٍ فيزيائية أو كيميائية (الشكل رقم ٦,٣)، باستخدام ناقلات عدة (الجدول رقم ٦,٢). بالإضافة إلى ذلك، فالكثير من المواد الشائعة، وبعض منهم من غير المرجح في اللمحة الأولى، يمكن استخدامها، مثل رقائق الخشب [٥٩]، الحجر الإسفنجي [٦٠]، والزبيب الجاف [٦١]، وقشر البرتقال [٦٢]. وتؤدي خصائص الناقل دوراً رئيساً في أداء المحفز الحيوي المقيد وستكون هناك حاجة لمجموعة معينة من الخصائص. وتشمل هذه ما يلي:

obeikandl.com

● مساحة السطح: مساحة السطح الكبيرة (فوق ١٠٠ م٢/ جم) [٥٦] متوقعة في كثيرٍ من الأحيان، والتي تأتي في صالح الناقلات المسامية. في الحالة الأخيرة يجب أن تتسع المسام بما يكفي لاستيعاب المحفز الحيوي بحيث يمكن أن يهاجر وسط التفاعل والمنتج بسهولة.

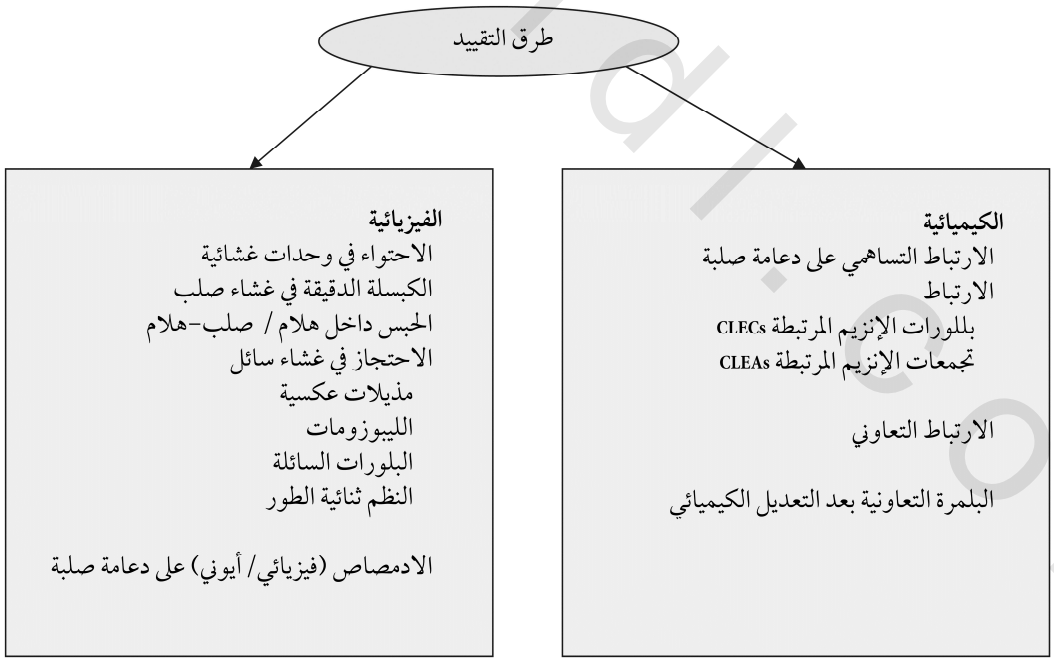
● غير قابل للذوبان في وسط التفاعل.

● ثبات ميكانيكي وكيميائي وحيوي، وذلك لتحمل الإجهاد الهيدروديناميكي والميكانيكي، وتكون خاملة للمواد الكيميائية في وسط التفاعل وللتحلل الميكروبي. سهولة التجديد (في حالة الناقلات غالية الثمن).

● شكل وحجم الدعامة؛ لأنه يؤثر في انخفاض الضغط المترابط ومعدل التدفق في مفاعلات العمود، وعليه معدل الترشيح خلال الاسترداد في طريقة الدفعة المتكررة، وكذلك الانتشار. وقد تكون الجسيمات الكروية ذات قطر من ١٥٠ حتى ٣٠٠ ميكروميتر هي الوسيلة الأفضل [٥٦] ولكن للتحويلات الحيوية على مقياس النانو.

● طبيعة الناقل المحب للماء/ الكاره للماء، حيث إنها تؤثر في التقييد غير التساهمي وعلى توافر وتوزيع وسط التفاعل/ المنتج.

● طبيعة، وكثافة السطح، وتوزيع المجموعات الوظيفية.



الشكل رقم (٦,٣). تصنيف طرق التقييد. بتصرف من [١٩، ٥٦-٥٨].

obeikandi.com

الجدول رقم (٢, ٦). أمثلة للناقلات شائعة الاستخدام لتقييد المحفزات الحيوية.

البوليمرات الطبيعية	الكربوهيدرات: الأجار، الأجاروز، الألجينات، الكيتين، الكيتوزان، الديكستران، الجيلان، الكابا-كاراجينان، البكتين، البكتات، البكتينات البروتينات: الكيراتين، الكولاجين، الجيلاتين
البوليمرات المخلقة	البولي أكريلات، البولي أميدات، البولي بروبيلين، البولي ستيرين، البولي زيلوسان، البولي يوريثان، البولي فينيلات، بوليمرات الزيلان/ السيليكا جل، أكسيدات المعادن الانتقالية

وقد يتطلب تقييد المحفز الحيوي على سطح ناقل صلب تعديلات كيميائية (تنشيط) للمحفز الحيوي [٦٣] أو للناقل [٥٦]، وفي كثيرٍ من الأحيان ما يؤدي الأول إلى خسارة حادة في النشاط. وبدلاً من ذلك يمكن استخدام عامل ازدواجي كوسيط بين المجموعات الوظيفية للمحفز الحيوي والناقل، والتي قد تؤدي أيضاً دور الفاصل، مما يقلل من عائق الفراغية. وفي نهجٍ أكثر تهذيباً، يمكن استخدام تقنية الحمض النووي المؤتلف لتعديل المحفز الحيوي، حتى يمكن أن يدمص على ناقل معين. وتنتشر هذه الأساليب، أو خليط منها، على نطاقٍ واسع، ويتم نشر طرق جديدة أو منهجيات محسنة بمعدل كبير. وبصفة خاصة فإن استخدام تغليف محلول المادة الهلامية يجمع أهمية كبيرة حيث إنه يعطي محفزات حيوية مرنة وقوية [٦٤، ٦٥]، وكذلك مجاميع الإنزيم المرتبطة [٥٨]، وبلورات الإنزيم المرتبطة [٦٦]، والتحفيز الحيوي في مستوى النانو [٦٧، ٦٨].

في ضوء مقياس النانو متناهي الصغر لجزيئات الإنزيم، فإن هذه المحفزات الحيوية يمكن فقط أن تستفيد من نسب مساحة السطح الكبيرة إلى الحجم للمواد النانومترية. وتشمل هذه المواد جسيمات النانو المصنوعة من السيليكا، وأكسيد الحديد الأسود (الماجنتيت) والذهب وأنابيب الكربون النانوية، وألياف النانو البوليمرية. ويمكن أن يجمع التركيب النانوي بين مكونات محبة وكارهة للماء، وبالتالي تسهل انتشار أوساط التفاعل المحبة للماء والنواتج إلى/ من مرحلة محبة للماء حيث يكون الإنزيم مقيداً. ويسمح هذا النهج بزيادة قدرها أكثر من ٢٠٠ ضعف في عدد تحول التفاعلات المحفزة بإنزيم بيروكسيديز الفجل في الهيبتان، بالمقارنة مع الإنزيم الحر [٦٩].

ويبدو أن نهج مقياس النانو يوفر حلاً مناسباً للقضايا المتناقضة في كثيرٍ من الأحيان التي يتم التعرض لها في تحسين نظم الإنزيمات المقيدة، وهي مساحة السطح الكبيرة وتحميل الإنزيم التي عادة ما تؤدي إلى مشكلات نقل الكتلة خلال الدعامات. وهناك بعض السلبيات، رغم ذلك، وخصوصاً انتشار الجسيمات في بيئة التحويل الحيوي واستردادها، ومحدودية ترتيب المفاعل الحيوي، والشواغل الصحية والبيئية المرتبطة بمعالجة الجسيمات النانوية [٦٧، ٦٨].

على الرغم من كونه مفيداً للغاية، إلا أنه غالباً ما يؤدي التقييد إلى تغييرات في خصائص المحفز الحيوي (الجدول رقم ٦,٣). وهذه يجب أن يتم تقييمها بعناية، حيث إنها تتداخل في تصميم العملية. بغض النظر عن العدد الواسع من الطرق الدعامات المتاحة، فليس من الممكن أن نخص بالذكر طريقة واحدة، ودعامة واحدة على أنها هي الأنسب لجميع المحفزات الحيوية والتطبيقات. ويجب اختيار الدعامة وطريقة التقييد بعين الاعتبار طبيعة وخصائص وسط التفاعل، المنتج، والمحفز الحيوي. فعلى سبيل المثال، تتسرب الإنزيمات المنخفضة الوزن الجزيئي بسهولة من الدعامات القائمة على الهلام؛ وإذا استخدمت أوساط التفاعل كبيرة الجزيئات في نظام التحويل الحيوي، فإن طريقة الانحباس ليست أيضاً خياراً جيداً؛ نظراً لقيود الانتشار القصوى؛ إذ إن أوساط التفاعل الكارهة للماء لا تنقسم إلى الدعامات المحبة للماء.

الجدول رقم (٦,٣). تأثير التقييد على حركية وخصائص المحفز الحيوي.

تأثيرات تشكيلية	تغيرات في التركيب الرباعي للإنزيمات عند الارتباط بناقل صلب؛ تغير طبيعة الإنزيم الناتجة من تأثير الكيماويات المستخدمة في طرق انحباس/ تغليف. تغيرات في علاقة درجة الحرارة بالنشاط، وفي الثبات الحراري والتشغيلي والتخزيني بالمقارنة مع الصورة الحرة الغير مقيدة.
تأثيرات فراغية	موانع ثلاثية الأبعاد والتي تحد من الوصول إلى وسط التفاعل.
تأثيرات تقسيمية	تحدث هذه عند شحن الناقل أو أن له طبيعة محبة/ كارهة للماء على العكس من بيئة الوسط. وينتج عنها تركيزات مختلفة من المركبات في كل جهة من السطح البيني. تغير في علاقة الأس الهيدروجيني بالنشاط. نفس الاستنتاج عند شحن المركبات المستخدمة أو لها طبيعة محبة/ كارهة للماء على العكس من الناقل.
تأثيرات نقل الكتلة	حيث إن وسط التفاعل يجب أن يهاجر من بيئة الوسط إلى الموقع النشط للمحفز الحيوي المقيد، تحدث مقاومة في نقل الكتلة الخارجي والداخلي (الانتشار)، الأخير يكون فقط في الدعامات المسامية. يمكن أن تقلل معدلات التدوير العالية من مقاومات نقل الكتلة الخارجي. تحدث مقاومة الانتشار خلال التفاعل، ولذلك يعتمد معدل التفاعل الكلي على تركيز وسط التفاعل والمسافة من سطح الدعامة الخارجية.
تأثيرات أخرى	تغيرات في التخصصية، ثوابت الحركية، الثبات الحراري والتشغيلي والتخزيني للمحفز الحيوي المقيد بالمقارنة مع الصورة الحرة غير المقيدة.

وعلاوةً على ذلك، فكل الطرق تقدم مزايا وسلبيات. فالادمصاص أو الامتزاز بسيط ورخيص وفعال ولكن في كثيرٍ من الأحيان يتم عكسه بسهولة بالتغيرات في درجة الأس الهيدروجيني، وأيونية المحلول أو الظروف

الهيدروديناميكية؛ وتضمن طرق التعلق والارتباط التساهمي تقييد قوي ودائم، مع ثبات طويل المدى، لكنها مكلفة وغالباً ما يقل نشاط الإنزيم بصورة كبيرة مع التقييد. وترتبط طرق الانحباس، والكبسلة الدقيقة، وحبس مفاعل الغشاء عادةً بمقاومات نقل كتلة كبيرة، ولاسيما الأولى، على الرغم من أنها طرق معتدلة جداً التي تؤثر بالكاد في النشاط الحفزي الجوهري. ويمكن تحويل مقاومات نقل الكتلة هذه إلى ميزة في مفاعلات الغشاء لتحويل أوساط التفاعل عالية الوزن الجزيئي أو غير القابلة للذوبان، مثل النشا، والسليولوز، والإنيولين، أو البروتينات، حيث يحتفظ الغشاء بها جنباً إلى جنبٍ مع المحفز الحيوي، الموجود في صورة ذائبة (الإنزيم) أو معلقة (الخلايا)، بينما يسمح للنواتج منخفضة الوزن الجزيئي بالخروج. ولذلك فاختيار ظروف التقييد الأكثر مناسبة لمحفز حيوي معين هي عملية محاولة وخطأ، تهدف إلى تحديد أفضل حل وسط من أجل الإبقاء على النشاط الحفزي والثبات التشغيلي.

(٦,٢,٢) بيئة التحويل الحيوي The Bioconversion Medium

بعد اقتصارها فقط على التطبيق في البيئات المائية المتجانسة، فقد أثبتت عمليات التحويل الحيوي كونها فعالة في وجود المذيبات العضوية (القابلة للامتزاج بالماء أو غير القابلة للامتزاج) [١٩، ٧٠]، والسوائل الأيونية [٧١، ٧٢]، والسوائل ذات درجات الحرارة فوق الحرجة [٧٣، ٧٤]، والمرحلة الغازية [٧٥]، والنظم المائية ذات المرحلتين [٧٦]، وفي البيئات السائلة-الصلبة (المساعدة بالراتنجات) [٢٢]. وعادةً ما تتم تسمية هذه المناهج بأنها "محفزات حيوية غير تقليدية". وهناك أمثلة توضيحية للتطبيقات الحديثة في الجدول رقم (٦,٤). والأسباب الرئيسة الكامنة وراء الحاجة إلى بيئات تحويل حيوي أخرى غير المائية هي القابلية الشحيحة للذوبان في الماء لمعظم أوساط التفاعل و/ أو النواتج في هذه البيئات، فضلاً عن الدور المحتمل السام أو المثبط لهذه المركبات على المحفز الحيوي، والذي يمكن خفضه إذا كان المحفز الحيوي والمركبات في مراحل مختلفة. في كلتا الحالتين، يمكن أن تتأثر الإنتاجية بشدة إذا تم التحويل الحيوي في بيئة مائية.

وفقاً لستراتهوف [٩٣]، فإنه في حالة المركبات ذات ذوبان مائي بين حوالي ٠,٠٠٠٣ و ١ مولار، فإنه تكون هناك حاجة إلى مرحلة ثانية للوصول إلى إنتاجية مقبولة. علاوةً على ذلك، فقد وجد أن تركيز وسط التفاعل ونقاء النواتج المتماثلة يرتبط عكسياً في عدة نظم تحويل حيوي، وعليه تخفض تركيز وسط التفاعل في بيئة التفاعل مما يعزز الانتقائية [٩٤]. ويمكن أن تستخدم مرحلة مساعدة ثانية كميزة، لتوفير تجمع للمركبات شحيحة الذوبان في المرحلة حيث يوجد المحفز الحيوي و/ أو الحفاظ على تركيزها في مرحلة تحت المستويات السامة/ المثبطة.

الجدول رقم (٤, ٦). بعض الأمثلة الحديثة لنظم التحويل الحيوي غير التقليدية.

المحفز الحيوي	النظام	المرجع
تجمعات إنزيم البنيسيلين أسيليز المرتبطة وإنزيم البنيسيلين أسيليز المرتبط على السطح الهلامي للبولي أكريلاميد	تخليق السيفاليكسين في بيئة الإيثيلين جليكول	[٧٧]
ألفا-أميليز والجلوكوأميليز	تحلل النشا في أنظمة البولي إيثيلين جليكول/ ديكستران المائية ثنائية المرحلة	[٧٨]
الليبيزات المغلفة في الهلاميات العضوية المعتمدة على المستحلبات الدقيقة	أسترة حمض اللاوريك و١-بروبانول في ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج	[٧٩]
إيشيريشيا القولون المؤتلفة المحتوية على الزايلين مونوأوكسيجينيز	أكسدة البسودوكومين إلى ٤,٣-داي ميثيل بنزالدهيد في (٢-إيثيل هيكسيل) فثالات: بيئة مائية صغرى	[٨٠]
الليبيز	تحليل أسترات الإيبوكسي إينول في محلول أس هيدروجيني:هيكسان	[٨١]
الليبيز المقيد	أسيلة النارينجين والروتين بفينيل البيوتيرات في السوائل الأيونية	[٨٢]
سكارروميسيس سيرفيسي	اختزال ٤-كلورو أسيتوأسيتات لينتج (س)-٤-كلورو-٣-هيدروكسي بيوتانوات في السوائل الأيونية	[٨٣]
الليبيز	الأسترة الاختيارية للنظائر الضوئية لـ (±)-مينتول في السوائل الأيونية والمذيبات العضوية	[٨٤]
الليبيز المقيد على ألياف الكربون	الأسترة الناقلة بين فينيل أسيتات و ن-بروبانول في المرحلة الغازية	[٨٥]
خلايا الرودوكوكس أريثروبولسي المجففة	تحليل ١-كلوروبيوتان وحمض الهيدروكلوريك في المرحلة الغازية	[٨٦]
الليبيز	تخليق استرات كحول الأيزوأميل في ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج	[٨٧]
الليبيز المقيد والكيوتينيز المقيد	الأسترة الناقلة ل(ر، س)-٢-فينيل-١-بروبانول بفينيل البيوتيرات في البيئات فوق الحرجة، السوائل الأيونية والمذيبات العضوية	[٨٨]
سلالة إيشيريشيا القولون المعبرة بإفراط للسيكلوهيكسانون مونوأوكسيجينيز	أكسدة باير-فيليجر الغير متماثلة باستخدام تغذية وسط التفاعل في الموقع وإزالة المنتج براتنج دويكس أوبتيبور ل-٤٩٣	[٨٩]
سلالة مايكوباكتريوم NRRL B3805	انشقاق السلسلة الجانبية للسيتوستيرول في محلول الأس الهيدروجيني ديوكتيل فثالات: تريس هيدروكلوريك	[٩٠]
الليبيز	الأسيلة المختارة للجليكوزيدات في الشوائل الأيونية	[٩١]
إيشيريشيا القولون المؤتلفة	نزع مجموعة الأسيل من البنيسيلين ج لحمض ٦-الأمينوبينيسلانيك في البولي إيثيلين جليكول/ فوسفات البوتاسيوم	[٩٢]

(١ ,٢ ,٢ ,٦) المذيبات العضوية Organic Solvents

يعد استخدام المذيبات العضوية في بيئة التحويل الحيوي إلى حدٍ بعيد من أقدم البدائل للنظم المائية النقية [٩٥-٩٧]، ولكن تم تأسيس هذا النهج فقط في أوائل تسعينيات القرن الماضي [٩٨]. ومزايا هذا النهج وعيوبه مؤكدة (الجدول رقم ٥ ,٦).

ويمكن لنظم التحويل الحيوي المحتوية على المذيبات العضوية أن تكون إما متجانسة وإما غير متجانسة، وهذا يتوقف على ما إذا كانت المذيبات المستخدمة قابلة للامتزاج بالماء (على سبيل المثال، الأسيتونيتريل، سلفوكسيد ثنائي الميثيل، وجلايكول الإثيلين، الجلسرين، والميثانول، البروبيلين جلايكول) أو غير قابلة للإمتزاج بالماء (أثير ثنائي الأيزوبروبيل، خلات الإيثيل، أثير الميثيل-تي-بوتيل، أوكتان، ن-أوكتانول والتولوين). وتفضل النظم الأخيرة تكامل العملية؛ نظراً لأنها تسمح باسترداد المنتج مباشرة وتوفر تجمع لأوساط التفاعل/ المنتجات السامة أو المثبطة، حيث إنه توجد فقط كميات ضئيلة منها المرحلة المائية. كما أنها أيضاً تمكن الحفز البيني من خلال إتاحة سطح بيني مائي-عضوي، والذي يكون مطلوباً لبعض الإنزيمات لإظهار النشاط المطلوب (التنشيط البيني)؛ وذلك نتيجة للتغيرات التشكيلية عند الإدمصاص أو الامتزاز على السطح البيني المعين [٩٣، ٩٩، ١٠٠].

الجدول رقم (٥ ,٦). مميزات وعيوب استخدام المذيبات العضوية في بيئات التحويل الحيوي.

المميزات	تحسين الذوبان لأوساط التفاعل والنواتج غير القطبية، زيادة إنتاجية الحيز/ الوقت وكذلك الإنتاجية الحجمية عكس التوازن الحراري الديناميكي، مفضلاً التخليق على التحلل. يتيح التفاعلات غير المفضلة في البيئات المائية (على سبيل المثال: الأسترة الناقلة، أسترة مجموعة الثيو، تحلل مجموعة الحمض الأميني) يمكن عكس انتقائية المتشابهات اعتماداً على المذيب العضوي يتم تجنب التفاعلات الجانبية المعتمدة على الماء الغير مرغوبة يتم تقليل التلوث الميكروبي ثبات الإنزيم في البيئة قليلة الماء
العيوب	تغير طبيعة المحفز الحيوي و/ أو تثبيطه بالمذيبات العضوية زيادة تعقيد النظام عوائق تقسيمية وعوائق نقل الكتلة (في النظم العضوية-السائلة ذات المرحلتين السائلتين) التثبيط البيني للإنزيمات (في النظم العضوية-السائلة ذات المرحلتين السائلتين)

obeikandl.com

ويمكن تقسيم النظم غير المتجانسة أكثر إلى نظم غير متجانسة دقيقة وكبيرة. ويلاحظ في النظم غير المتجانسة الدقيقة فصل المراحل فقط على النطاق المجهري، كما في حالة المذيلات العكسية، في حين أنه في النظم غير المتجانسة يوجد فصل واضح بين المراحل، كما يحدث في النظم ذات المرحلتين السائلتين، أو النظم التي تستخدم الإنزيمات المسحوقة أو المقيدة.

ويمكن إرجاع سمية المذيبات العضوية، وهي مشكلة رئيسة مرتبطة باستخدامها في نظم التحويل الحيوي، إلى التفاعلات مع المجموعات غير القطبية للإنزيم والتعطيل النهائي للتفاعلات الكارهة للماء، والتنافس مع جزيء البروتين على الماء الأساسي المطلوب من قبل هذا الأخير للتشكيل السليم لسلسلة البولي بيبتيد. ويمكن للمذيبات في نهاية المطاف أن تنزع مثل طبقة المياه الأساسية هذه. وعندما تستخدم الخلايا الكاملة، يمكن أن يعزى التأثير الضار للمذيب إلى تراكمه في الغشاء السيتوبلازمي، مغيراً من تركيبه ومانعاً الخلية من القيام بمهامها الرئيسة، مثل تبديد درجة الحموضة والجهد الكهربائي ومثبطاً لوظائف بروتين الغشاء، مما يؤدي في نهاية المطاف إلى تحلل الخلايا وموتها [١٠١].

يجب أن تؤخذ عدة جوانب في الاعتبار عند التفاعل بين المذيب، ووسط التفاعل، والناتج، والمحفز الحيوي. يجب أن يتوافق المذيب المناسب حيوياً مع المحفز الحيوي، وأن يظهر تجاذب عالٍ مع أوساط التفاعل و/ أو النواتج، وأن يكون رخيصاً، وغير قابل للتحلل الحيوي، وغير سام للإنسان، وله درجة غليان عالية نسبياً (تفضيلياً أقل من الماء)، ويكون قليل التطاير. وينبغي أيضاً أن يؤخذ في الاعتبار أن المذيب العضوي قد يؤثر على انتقائية المحفز الحيوي. وقد بذلت جهود واسعة النطاق للتنبؤ بالتوافق الحيوي للمذيب على أساس الخصائص الفيزيائية للمذيب. ومعامل هانش (لوغاريتم P_{oct} أو قيمة π)، أي لوغاريتم معامل التقسيم في نظام قياسي ذي مرحلتين من أوكتانول–ماء، هو المعيار الأكثر استخداماً لتوقع التوافق الحيوي. وهو يقترح أنه كلما زاد اللوغاريتم P_{oct} كلما كان المذيب أكثر توافقاً حيوياً؛ ومعظم الخلايا الكاملة متوافقة فقط مع المذيبات ذات لوغاريتم P_{oct} أعلى من ٤. ومع ذلك، فهي بعيدة عن كونها مضمونة [٩٣].

ويمكن إرجاع محدودية مثل هذا النموذج التنبؤي إلى الآليات التي تشمل تفاعلات المحفز الحيوي/ المذيب، والتي تكون معقدة للغاية بالنسبة للتوافق الحيوي للمذيب بحيث يمكن التنبؤ بها بواسطة معيار فيزيائي واحد [١٠٢، ١٠٣]. ويجب اختيار الظروف الهيدروديناميكية المناسبة وقيم نسبة حجم المرحلة عند تصميم نظام التحويل الحيوي، من أجل تعزيز نقل الكتلة ومن ثم زيادة معدل التفاعل الكلي. ويجب أعطاء عناية خاصة لتفادي استحلاب بيئة التفاعل، مما يحد من نقل الكتلة. علاوةً على ذلك، قد تكون المفاعلات ذات احتياطات السلامة الإضافية، أي مبدأ الحماية من الانفجار، مطلوبة [١٠٤].

(٦,٢,٢,٢) السوائل الأيونية Ionic Liquids

نظراً للضغوط المتزايدة من المنظمات الحكومية والكيانات التنظيمية والمنظمات غير الحكومية، والرأي العام من أجل حماية البيئة، فإن هناك اتجاهاً لتطوير مذيبات بديلة مناسبة والتقنيات التي يمكن أن تحل محل المذيبات العضوية التي تعدُّ مسؤولة عن إنتاج النفايات الخطرة. والسوائل الأيونية هي أملاح تكون في حالة سائلة في درجة حرارة غرفة، وعلى عكس المذيبات العضوية، فإنها عملياً ليس لديها أي ضغط بخاري، وتوفر إمكانية تطوير العمليات الخضراء النظيفة. وكما هو الحال مع المذيبات العضوية، توجد سوائل أيونية قابلة/ وغير قابلة للامتزاج بالماء.

يمكن تكييف الخصائص الفيزيائية للسوائل الأيونية، مثل الكثافة، وطبيعة التفاعل مع الماء، ودرجة الذوبان، واللزوجة؛ وذلك لتلبية متطلبات نظام التحويل الحيوي عن طريق تغيير طبيعة الأنيونات والكاتيونات. والسوائل الأيونية لديها علاوةً على ذلك ثبات حراري وتخزيني مرتفعين، والقدرة على إذابة مجموعة واسعة من المركبات، من غير العضوي إلى العضوي، والبوليمرية، وهي أيضاً غير تفاعلية، ويمكن أن تستخدم في تفاعلات انتقائية المتشابهات وانتقائية المجسمات [٧٢].

وتحتفظ إنزيمات الهيدروليزات، مثل البروتييز والليبزات، والأوكسيدوريداكتيزات، والديهيدروجينيزات بنشاطها الحفزي في وجود السوائل الأيونية، ويبدو أن جميع الإنزيمات التي تعمل في المذيبات العضوية تعمل أيضاً في السوائل الأيونية. وقد تبين أن استخدام السوائل الأيونية يزيد من النشاط الإنزيمي، والثبات، وانتقائية المتشابهات والمجسمات بالمقارنة مع استخدام المذيبات العضوية، ولكن هذا الاتجاه ليس مطلقاً [٩١، ٩٤، ١٠٥]. فقد وجد أن جميع السوائل الأيونية ليست مناسبة للتحفيز الحيوي. فالإنزيمات تميل إلى الاحتفاظ بالنشاط الحفزي في السوائل الأيونية التي تحتوي على فوسفات ثنائي الميثيل، بورات رباعي الفلور (كلاً يذوب في الماء)، بيس-ميثيل ثلاثي الفلور-أميد السلفونيل، فوسفات سداسية الفلور (كلاً لا يذوب في الماء)، ولكن ليس في السوائل الأيونية التي تحتوي على الكلور، والنترات، وسلفيد الكربون ثلاثي الفلور، أو أنيونات الخلات [١٠٦، ١٠٧]. كما وجد أن الخلايا الكاملة أيضاً تحتفظ بنشاطها في السوائل الأيونية التي تحتوي على بيس-ميثيل ثلاثي الفلور-أميد السلفونيل، فوسفات سداسية الفلور [٨٣]. ومع ذلك، فإن استخدام السوائل الأيونية في التحويلات الحيوية بالخلايا الكاملة يكون أقل انتشاراً منه في التحفيز الحيوي الإنزيمي.

عند اختيار سائل أيوني مناسب للتطبيق في نظام تحويل حيوي، لابد من مراعاة بعض القضايا. ينبغي أن يكون السائل الأيوني متاحاً خالياً من الشوائب التي قد تعرقل العملية، وغير مسبب للتآكل، وغير سام، ومتوافق حيوياً. وعلاوة على ذلك، يجب أن تكون الأساليب المناسبة لعزل المنتج، مثل التقطير، وثاني أكسيد الكربون فوق الحرج، والفصل اللوني بالعمود، أو الاستخلاص قابلة للتطبيق. ونظراً لتكلفة السوائل الأيونية، التي يمكن أن

تكون أكبر بضعفين من المذيبات العضوية الشائعة، فإن جدوى استخدام السوائل الأيونية على نطاقٍ واسع تعتمد بقوة على الاسترداد الفعال للسائل الأيوني وإعادة استخدامه [١٠٥]. ومن أجل أن يستخدم بفعالية، يجب أن يذيب السائل الأيوني المركبات الموجودة بما لا يقل عن ما يصل إلى عدة مئات من الميللي مولار، ويجب أن يكون معامل التوزيع لوسائط التفاعل والنواتج بين السوائل الأيونية ومحلول الأس الهيدروجيني أعلى من ٠,٢، وذلك من أجل كفاءة الاستخلاص، وخفض تركيزها في المرحلة المائية، وبالتالي السمية [٨٣].

(٦,٢,٢,٣) النظم المائية ذات المرحلتين Two-Phase Aqueous Systems

تتكون النظم المائية ذات المرحلتين من محلولين اثنين من البوليمرات غير المتوافقة، على سبيل المثال البولي إيثيلين جلايكول والدكستران، أو محلول بوليمر يذوب في الماء مع محلول آخر من الملح، مثل محلول الفوسفات المنظم أو كبريتات المغنيسيوم، مع توتر بيني منخفض بين المرحلتين. وتوفر هذه النظم بيئة معتدلة نسبياً للمحفزات الحيوية ومناسبة بصفة خاصة لاستخلاص المنتجات المحبة للماء [٧٦]. وتقع المشكلات الرئيسة في تصميم نظم التحويل الحيوي المائية ذات المرحلتين بسبب عدم وجود نماذج مناسبة للتنبؤ بنشاط المحفز الحيوي، فضلاً عن تقسيم المحفز الحيوي والناتج، وقد أعيق تنفيذها على النطاق الواسع بالتكلفة المرتفعة للعديد من البوليمرات المستخدمة؛ بسبب مستويات نقائها. وإذا كانت رخيصة، فيمكن استخدام البوليمرات الأقل نقاءً بدون انخفاض كبير في الإنتاجية، وقد تقدم النظم المائية ذات المرحلتين بديلاً مثيراً للاهتمام لنظم التحويل الحيوي المحتوية على مركبات محبة للماء [٧٨].

(٦,٢,٢,٤) الراتنجات الصلبة Solid Resins

تضاف الراتنجات ذات مساحة السطح الكبيرة إلى بيئات التحويل الحيوي للتغلب على القيود المرتبطة بتثبيط الناتج من خلال استرداد الناتج في الموقع [٩٤]، أو لتجنب استخلاص السائل-السائل من بيئات التحويل الحيوي ذات الخلايا الكاملة [١٠٨]، حيث يتم نقل الناتج إلى الراتنج عند تكوينه. ويمكن أيضاً أن تستخدم الراتنجات لتسليم وسط التفاعل، الأمر الذي يتطلب التشبع السابق للراتنج بوسط التفاعل، وذلك قبل تحضينه في بيئة التحويل الحيوي التي يتم تسليمه إليها. ويمكن أيضاً أن توفر الراتنجات تغذية وسط التفاعل في الموقع واسترداد الناتج [٨٩].

ويشبه المفهوم الكامن وراء النظم القائمة على الراتنج ذلك في النظم المائية ذات المرحلتين، لكنه يتجنب الآثار الضارة على المحفز الحيوي التي تظهر في كثيرٍ من الأحيان عند استخدام المذيبات العضوية (أو السوائل

الأيونية)، على الرغم من أن تحميل الراتنج العالي قد يؤدي إلى أضرار لا رجعة فيها للمحفز الحيوي [٩٤]. وعند اختيار مرحلة صلبة مناسبة، يجب أن تعطي عناية خاصة إلى انجذاب وسط التفاعل، الناتج، والمحفز الحيوي نحو الراتنج. فقد يؤدي الإفراط في ارتباط وسط التفاعل بالراتنج إلى انخفاض توافره الحيوي لها في المرحلة المائية. ويجب أيضاً تجنب امتزاز المحفز الحيوي على المرحلة الصلبة.

(٦,٢,٢,٥) نظم الغاز–الصلبة Solid-Gas Systems

تقدم نظم الغاز الصلبة الكثير من المزايا على النظم القائمة على السوائل، وهي نقل الكتلة المحسن؛ نتيجة ارتفاع معاملات الانتشار واللزوجة المنخفضة للغازات، والذوبان المحسن لأوساط التفاعل والنواتج، وفي نهاية المطاف التخلص من استخدام المذيبات، وكذلك التقليل من وجود التلوث الميكروبي؛ نتيجة درجات الحرارة المرتفعة نسبياً المستخدمة (على سبيل المثال، ٤٥ إلى ٨٥ درجة مئوية)، وانخفاض مخاطر تكوين المنتجات الثانوية، والطرق المبسطة للتقييد، وسهولة استرداد النواتج (وأوساط التفاعل غير المتفاعلة) عن طريق التكثيف والحد من التدمير الحراري، نظراً لحالة المحفز الحيوي الجافة جزئياً [٨٥، ١٠٩]. بالإضافة إلى ذلك، فإن هذه النظم توفر معلومات مفيدة عن التفاعلات بين المحفزات الحيوية وبيئاتها الدقيقة، والتأثير المصاحب على النشاط والثبات الحفزي، حيث إن الأنشطة الحرارية الديناميكية لمختلف الأنواع يمكن تثبيتها بصورة مستقلة [١٠٩].

وتشمل الملامح الرئيسة في تصميم النظام إستراتيجية لتكوين مرحلة غازية، وضغط العمل المطلق، والنشاط الحراري الديناميكي للماء.

(٦,٢,٢,٦) السوائل فوق الحرجة Supercritical Fluids

يمكن ربط الاهتمام باستخدام السوائل الحرجة (SCFs) بتزايد الاهتمامات البيئية مع كمية النفايات الناتجة عن الصناعة الكيميائية، ومعظمها مذيبات عضوية ونواتج ثانوية. تقدم السوائل الحرجة أيضاً مزايا فيما يتعلق بنقل الكتلة، حيث تكون انتشارية أوساط التفاعل والنواتج عالية، وتكون لزوجة بيئة التحويل الحيوي منخفضة، ويتم خفض قيود نقل الكتلة الداخلية والتي غالباً ما تكون عنق الزجاجة في التحويلات الحيوية غير المتجانسة؛ بسبب الانتشارية العالية للسوائل الحرجة.

والسائل الحرج الأكثر استخداماً في التحويلات الحيوية، ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج، هو غير مسرطن، وغير سام، وغير مطفر، وغير قابل للاشتعال، وثابت حرارياً، وعليه يقدم منافع واضحة متعلقة بالصحة والسلامة. كما أنه أيضاً صديق للبيئة ويمكن إعادة تدويره. ومع ذلك، فإن طبيعته غير القطبية تفضل عادةً تطبيق

ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج عند استخدام مركبات كارهة للماء. وقد أدت الجهود البحثية الأخيرة إلى تطوير المواد المقللة للتوتر السطحي التي تسمح بإذابة كلٍ من الكيماويات المحبة والكارهة للماء، والتي قد توسع من نطاق تطبيقات ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج في التحويلات الحيوية [٧٤].

وتفتقر السوائل الحرجة الأخرى المستخدمة في التحفيز الحيوي، مثل الإيثان فوق الحرج [٨٨]، والبروبان فوق الحرج، والبيوتان فوق الحرج [٧٣، ١١٠] إلى الطابع "الأخضر" [٧٤]. ومن ناحيةٍ أخرى، فإن الماء لديه انجذاب لهذه السوائل أقل من ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج، ومن ثم يقل خطر إزالتها للماء الضروري من جزيئ الإنزيم [٧٣].

وعند تصميم نظام تحويل حيوي على استخدام هذه الغازات الكثيفة، فإنه يجب التصدي لعدة قضايا رئيسة. وتشمل هذه اختيار المذيب، جنباً إلـى جنبٍ مع العوامل التي تؤثر على النشاط/ الثبات الإنزيمي، والتي تكون فـي هذه النظم المعينة الضغط، وزيادة الضغط/ خفض الضغط، والنشاط المائي. ويجب القيام بمثل هذا التقييم فـي البحوث التجريبية، حيث إنه حالياً يكاد يكون من المستحيل توقع نشاط/ ثبات المحفز الحيوي في وجود السوائل الحرجة.

(٦,٣) المفاعلات الحيوية Bioreactors

تتم عادةً التحويلات الحيوية في المفاعلات الكيميائية الأساسية، التي تعمل بنظام الدفعة، والتغذية المستمرة، أو التغذية على دفعات. ويعد النظام الأخير بديل مناسب لاستخدام مرحلة ثانية مساعدة عندما يكون وسط التفاعل سام/ مثبط فوق تركيز معين و/ أو شحيح الذوبان في المرحلة المائية. وتتطلب تحكماً دقيقاً حيث يمكن حدوث قيود لوسط التفاعل [١١١]. ومفاعلات نظام الدفعة هي الأكثر شيوعاً (ولكن ليس حصراً) عند وجود المحفزات الحيوية الحرة. وإذا تم استخدام المحفزات الحيوية المقيدة في هذا النمط من العمليات، وإذا كان من الضروري إعادة استخدامها، فإن فصل واسترداد المحفز الحيوي يكون إلزامياً، والذي قد يجلب فقدان لكتلة المحفز الحيوي، فضلاً عن فقدان النشاط.

(٦,٣,١) مفاعلات الدفعة الواحدة Batch Reactors

على الرغم من أنه يشيع استخدام مفاعلات التقليب لإعطاء نمط خلط مثالي تقريباً وتجنب تدرجات التركيز (وخاصة في درجة الحموضة) ودرجة الحرارة، فإن جزيئات دعامة التقييد غالباً ما تكون حساسة للإجهاد. وهذا يعني أنه ينبغي استخدام المستحضرات المتينة فقط من المحفزات الحيوية في مفاعلات التقليب. والبديل عن

ذلك هو ما يعرف بمفاعل السلة، حيث يتم الاحتفاظ بجسيمات المحفز الحيوي المقيدة في سلة مشكلةً إما شفرات التقليب أو صدادات المفاعل. وثمة نهج أكثر شيوعاً يعتمد على نمط تدفق القابس. ويعمل نوع مفاعل تدفق القابس الذي قد يكون مفاعل الوسادة المعبأة أو المتخلخلة في وضع التدوير الإجمالي؛ وتكون هناك حاجة لذلك إذا أعطت دورة واحدة إنتاجية تحويل منخفضة. وتكون هذه الميزة أيضاً مفيدة بشكلٍ خاص للحصول على البيانات الحركية، حيث يمكن اعتبار المفاعل كمفاعل تفريقي. وعلاوةً على ذلك، يمكن بسهولة تقليل مقاومات نقل الكتلة الخارجية عن طريق التشغيل تحت معدلات تدفق عالية.

(٦,٣,٢) مفاعلات التغذية على دفعات Fed-Batch Reactors

في مفاعلات التغذية على دفعات تضاف مكونات المواد المتفاعلة/ البيئة بشكلٍ مستمر أو في شكل نبضات أو دفعات. يجب أن تعطى عناية خاصة لتأثير التغذية على حجم التفاعل، وبشكلٍ رئيس على الحالة الهيدروديناميكية وعلى مساحة سطح المفاعل الأولية؛ وذلك لتجنب فيضان بيئة المفاعل. رقابة ونمذجة العملية أكثر تعقيداً من طرق التشغيل الأخرى، والبحوث في هذا المجال خاصة المكرسة للمفاعلات الحيوية الإنزيمية نادرة [١١٢].

(٦,٣,٣) مفاعلات التغذية المستمرة Continuous Reactors

التشغيل المستمر للمحفزات الحيوية المقيدة له بعض المزايا عند المقارنة بغيرها من طرق التشغيل، وهي سهولة التحكم الآلي، وسهولة التشغيل، ومراقبة جودة المنتجات. ويمكن تقسيم المفاعلات المستمرة إلى نوعين: مفاعل خزان التقليب مستمر التغذية (CSTR) ومفاعل تدفق القابس (PFR). يتحقق التقليب الكامل في مفاعل خزان التقليب مستمر التغذية المثالي، وعليه لا تعتمد درجة التحويل على الموضع في الوعاء، وتكون الظروف في داخل المفاعل هي نفسها الموجودة في التيار الخارج، أي تركيزات منخفضة لوسط التفاعل وعالية من المنتج. وفي مفاعل تدفق القابس المثالي يعتمد عائد التحويل على طول الوعاء. إلا أن مفاعل تدفق القابس لا يحتوي على أجهزة تقليب وبذلك تتفاوت الظروف داخل المفاعل، عادةً مع تدرجات درجة الحرارة والسرعة والتركيز التي تكون في نفس اتجاه التدفق، وهذا ليس مثالياً.

وينبغي أن يأخذ الاختيار بين هذين النوعين بعين الاعتبار الخصائص الحركية والتشغيلية. وهكذا، من ناحية حركية ميكاياليس–مينتن، فإنه يفضل مفاعل تدفق القابس على مفاعل خزان التقليب مستمر التغذية؛ لأنه يتطلب محفزاً حيوياً أقل للوصول إلى نفس عائد التحويل. ونظراً لخصائص مفاعل تدفق القابس ومفاعل خزان

التقليب مستمر التغذية، فإن الأول يفضل للأنظمة ذات تثبيط المنتج، في حين ينبغي استخدام الأخير للأنظمة ذات تثبيط وسط التفاعل. ومع ذلك، إذا كان التحكم في درجة الحموضة مطلوباً، فلا ينصح باستخدام مفاعل تدفق القابس.

ويجب أن تعطى عناية خاصة لأبعاد المحفز الحيوي المقيد؛ فقد تؤدي الجسيمات إلى انخفاض كبير في الضغط، فضلاً عن الانسداد (انظر الجدول رقم ٥ ,٦).

ويمكن استخدام مفاعل الوسادة المتخلخلة (FBR) الذي له نمط تقليب متوسط لمفاعل خزان التقليب مستمر التغذية ومفاعل تدفق القابس المثالي، مع انخفاض الضغط الصغير. كما يمكن معالجة أوساط التفاعل غير الذائبة وعالية اللزوجة بصورة أفضل في مفاعل الوسادة المتخلخلة أو مفاعل خزان التقليب مستمر التغذية.

إن اختيار الـمفاعل المناسب ليس مهمة واضحة، وهذا يتطلب معرفة شاملة بمتطلبات نظام التحويل الحيوي المعين.

(٦ ,٤) ترشيد وتسريع تطوير وتوصيف عملية التحويل الحيوي

Rationalizing and Speeding up the Development and Characterization of a Bioconversion Process

إن نظم التحويل الحيوي معقدة جداً وتعتمد على مجموعةٍ واسعة من المتغيرات. وعليه، فإنه هناك حاجة إلى تطوير إستراتيجيات التخطيط الرشيد لتأسيس تخطيط رشيد تجريبي، إضافةً إلى الطرق السريعة والموثوق بها التي تسمح بتقييم الميزات ذات الصلة، وتوصيف النظام، لتعزيز وتيرة تنمية العملية. وتساهم الجهود المتفانية والتقنيات الحديثة جداً في جعل هذا الهدف حقيقة واقعة، من خلال الاستفادة بالتطورات في العلوم الحاسوبية والنظم والمكونات المنمنمة.

(١ ,٤ ,٦) الطرق الحسابية Computational Methods

توفر التطورات في العلوم الحاسوبية الأدوات التي تسمح بتنمية المبادئ التوجيهية لتخطيط تجريبي عقلاني، والسماح بذلك بتوفير الوقت والموارد. إن النمذجة الجزيئية والكيمومتريات هما مجالان حسابيان يكمل كل منهما الآخر، وعند اجتماعهما، يساهما على نحوٍ حاسم في تطوير نماذج التنبؤ. يمكن في النمذجة الجزيئية بناء نماذج تخيلية تسمح بفهم أفضل لتفاعلات الإنزيم مع وسط التفاعل. وتستند في معظمها على حساب الطاقة الحرة للتفاعل التي يتم الحصول عليها من محاكاة المرحلة الانتقالية للتفاعل. وعادةً ما يتم إجراء ذلك من خلال حسابات الميكانيكا الجزيئية، والتي تكون غير قادرة على توفير التوقعات الدقيقة. من ناحية أخرى فإن هذه الحسابات ليست مطالبة حسابياً وتقدم نتائج سريعة نسبياً. ولا تزال طرق ميكانيكا الكم معقدة للغاية ومطالبة حسابياً

لاستخدامها. ويعامل المنهج الوسيط بينهما الموقع النشط ووسط التفاعل على مستوى ميكانيكا الكم والنظام المتبقي على مستوى الميكانيكا الجزيئية، ولكن حتى هذا يمكن أيضاً أن يكون مطالباً حسابياً.

وتستخدم عادة تقنيات النمذجة الجزيئية لتوصيف تفاعلات الإنزيم مع وسط التفاعل، ويجري تطبيقها في التنبؤ بانتقائية الإنزيمات للمتشابهات [١١٣]. وتمكن الكيمومترات من ربط القياسات لنظام/ عملية كيميائي بحالة النظام من خلال سلسلة من الطرق الرياضية، التي تضم التحليل الإحصائي متعدد المتغيرات وتصميم التجارب. ويوفر هذا الأخير أداة لا تقدر بثمن لدراسة متغيرات متعددة في وقتٍ واحد وتحديد الظروف التجريبية المثلى، في حين أن السابق يمكن من تفسير البيانات الواردة في الأنظمة المعقدة التي تحتوي على عددٍ كبير من المتغيرات، عن طريق الحد من أبعادها [١١٤].

ويكون الجمع بين الطريقتين مفيد بشكلٍ خاص في تطوير نماذج التنبؤ، أي لإقامة معادلات أو معاملات تجريبية. وقد استخدم هذا النهج المزدوج بنجاحٍ في تعريف مجموعات الأحماض الأمينية الطرفية المسؤولة عن الانتقائية عند مقارنة أميدات البنسيلين-ج من مصادر مختلفة [١١٥، ١١٦].

(٦,٤,٢) طرق المعالجة دقيقة المقياس Microscale Processing Methods

يعتمد هذا النهج، على استخدام مفاعلات حيوية مصغرة ذات أحجام أقل من ١٠٠ مل، بالإضافة إلى تقنيات تحليل وأدوات قادرة على التعامل مع عدد واسع من العينات في وقتٍ قصير، وتتيح عملية الموازاة والتشغيل الآلي، وخفض التكاليف، سواءً في الموارد البشرية والمادية للمحاولات التجريبية. تشمل مثل هذه المفاعلات الحيوية المصغرة الأوعية المهتزة، مثل الدوارق المهتزة، وأنابيب الاختبار، والأطباق دقيقة المستوى، ذات أحجام وتصميمات مختلفة، وكذلك مفاعلات التقليب الحيوية المصغرة ومفاعلات الأغشية. وقد سهلت التطورات التقنية إمكانية رصد ومراقبة درجة الحموضة وتوتر الأكسجين المذاب مباشرة (على الأقل في بعض الحالات، وبعضها يشمل أيضاً التحكم بمعدل تدفق الهواء)، والتي تعزز من إمكانات هذه الأجهزة [١١٧-١١٩].

يتم حالياً استخدام المفاعلات الحيوية المصغرة في تطبيقاتٍ عدة، بما في ذلك التعديل الوراثي المبكر أو تقييم السلالات الأصلية للكائنات، وتحسين السلالة، وتطوير بيئة النمو/التحويل الحيوي [١١٨]. يجب أن توضع عناية خاصة للتأكد من أن الظروف التشغيلية هي تلك التي لا تخفي النتائج [١٢٠]. على سبيل المثال، إذا تم عن غير قصد العمل بالأوكسجين كوسط تفاعل محدد خلال تقييم تأثير تركيب البيئة على النشاط الحفزي، فإن نتائج مجموعة من التجارب يمكن أن تكون وهمية [١٢١]. ويصبح تكرار النتائج وزيادة المستوى من الأهمية

بمكان عند استخدام المفاعلات الحيوية المصغرة في المراحل المتأخرة لتطوير العملية. ويجب في مثل هذه الحالات أن يتم التحقق ما إذا كانت طرق قاعدة "الإبهام" التي تستخدم عادةً في الصناعة لزيادة المستوى من نطاق المعمل إلى نطاق الإنتاج قابلة للتطبيق. وتستند هذه الأساليب على معايير مختلفة، بما في ذلك المعامل الحجمي لانتقال كتلة الأكسجين (k_La)، واستهلاك الطاقة لكل وحدة حجم، وسرعة طرف المقلب، وثبات توتر الأكسجين المذاب، أو زمن الخلط. على الرغم من أخذ k_La واستهلاك الطاقة لكل وحدة حجم كمرجع، كما تم بصورةٍ متزامنة إحراز تقدم في تنمية الارتباط التجريبي للتنبؤ بمثل هذه العوامل [١٢٢، ١٢٣]، إلا أن تنوع العوامل يظهر أنه لا يوجد معيار واحد، وعلاوةً على ذلك ليست جميع النظم المصغرة مؤهلة للامتثال لجميع المعايير لزيادة المستوى [١١٨، ١١٩].

(٥, ٦) ملاحظات ختامية Concluding Remarks

هدف هذا الفصل إلى توفير منظور شامل للتحفيز الحيوي التطبيقي، مع التركيز الخاص على القضايا التي ينبغي التصدي لها عند تصور نظام تحويل حيوي معين، والمعايير ذات الصلة التي يجب النظر فيها لأفضل اختيار يتم استخدامه خلال المراحل المختلفة لمثل هذه العملية. تم توفير بعض المبادئ التوجيهية العامة التي تساعد في التصميم العام لنظام التحويل الحيوي، ولكن أشير إلى أنه لا توجد معايير عالمية، لذلك يحتاج كل نظام إلى اهتمام مفصل، وذلك بالنظر إلى المتطلبات الجوهرية. وقد عززت التطورات التقنية الحديثة من إمكانات مصمم المحفزات الحيوية، متيحةً التحول في نموذج تصميم نظم التحويل الحيوي من استخدام محفزات حيوية ذات خصائص موجهة لقيود التفاعل إلى تكييف الأول حسب متطلبات هذا الأخير. وتزيد قدرة المحفزات الحيوية على العمل في بيئات أخرى غير المائية من استخدام البيئات المحسنة للإنتاجية البديلة.

تحبذ المخاوف البيئية المتنامية تطوير وتنفيذ عمليات التحويل الحيوي "الخضراء"، باستخدام البيئات غير السامة الخالية من المذيبات العضوية (السوائل فوق الحرجة، والمذيبات الأيونية، والمرحلة الغازية). وهناك حاجة إلى العمل الواسع في مجال تطوير النماذج التنبؤية لتوقع السلوك في مثل هذه البيئات. وأيضاً تزداد القدرة التنافسية لنظم التحويل الحيوي ضد العمليات القائمة على الكيماويات، حيث إن إطار الوقت والموارد اللازمة لخطوات التنمية للعمليات القائمة على المحفز الحيوي تنخفض بشكلٍ حاد مع استخدام النظم المصغرة القادرة على تقييم وتحليل عدد كبير من المتغيرات في وقتٍ واحد وبسرعة. ويساعد الدمج بين النمذجة الجزيئية والتطورات في العلوم الحسابية على خفض التكاليف والوقت اللازمين لتطوير النماذج، والحد من عدد محاولات التجارب المطلوبة وتوفير أساس رشيد لهندسة المحفزات الحيوية. وتبرز كل هذه الميزات بشكلٍ واضح الاتجاهات الحالية من

أجل إرساء أساس أكثر عقلانية في تصميم وتطوير نظم التحويل الحيوي، وتطوير أسرع وأكثر موثوقية لأدوات الفحص وتعزيز التكامل بين مجالات المعرفة المكملة (الهندسة، وعلم الاحياء، والكيمياء، والرياضيات، وعلوم الحاسب) من أجل مزيد من تطوير العملية.

شكر وتقدير Acknowledgments

يشكر ب. فيرناندیز مؤسسة العلوم والتكنولوجيا، البرتغال، للعقد في إطار برنامج العلوم عام ٢٠٠٧م.

المراجع References

[١] Rozzell, J.D. (1999) *Bioorg. Med. Chem.*, **7,** 2253–2261.
[٢] Leresche, J.E. and Meyer, H.-P. (2006) *Org. Proc. Res. Develop.*, **10,** 572–580.
[٣] Panke, S. and Wubbolts, M. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13,** 111–116.
[٤] Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A., and Wackett, L.P. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, **68,** 4699–4709.
[٥] Schmid, A., Hollmann, F., Byung Park, J., and Bühler, B. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13,** 359–366.
[٦] Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005) *Biotechnol. Adv.*, **23,** 471–499.
[٧] Panke, S. and Wubbolts, M. (2005) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9,** 188–194.
[٨] Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J., and Ballesteros, A. (2006) *Trends Biotechnol.*, **24,** 281–287.
[٩] Fernandes, P. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73,** 291–296.
[١٠] Burton, S.G., Cowan, D.A., and Woodley, J.M. (2002) *Nat. Biotechnol.*,**20,** 37–45.
[١١] Rasor, J.P. and Voss, E. (2001) *Appl. Catal. A Gen.*, **221,** 145–158.
[١٢] Robertson, D.E. and Steer, B.A. (2004) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8,** 141–149.
[١٣] Bommarius, A.S. and Polizzi, K.M. (2006) *Chem. Eng. Sci.*, **61,** 1004–1016.
[١٤] Hult, K. and Berglund, P. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 395–400.
[١٥] Hibbert, E.G., Baganz, F., Hailes, H.C., Ward, J.M., Lye, G.J., Woodley, J.M., and Dalby, P.A. (2005) *Biomol. Eng.*, **22,** 11–19.
[١٦] Wahler, D. and Reymond, J.-L. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12,** 535–544.
[١٧] Becker, S., Schmoldt, H.-U., Adams, T.M., Wilhelm, S., and Kolmar, H. (2004) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15,** 323–329.
[١٨] Buchholz, K., Kasche, V., and Bornscheuer, U.T. (2005) *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
[١٩] Fernandes, P. and Cabral, J.M.S. (2006) Biotrans-formations, in *Basic Biotechnology*, 3rd edn (ed. Ratledge, C.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 579–626.
[٢٠] León, R., Fernandes, P., Pinheiro, H.M., and Cabral, J.M.S. (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, **23,** 483–500.
[٢١] Fernandes, P., Prazeres, D.M.F., and Cabral, J.M.S. (2003) Membrane-assisted extractive bioconversions, in *Process Integration in Bio-chemical Engineering–Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. **80** (eds L. van der Wielen and U. von Stockar), Springer-Verlag, Berlin, pp. 115–148.
[٢٢] Bechtold, M., Makart, S., Heinemann, M., and Panke, S. (2006) *J. Biotechnol.*, **124,** 146–162.
[٢٣] Buque-Taboada, E.M., Straathof, A.J.J., Heijnen, J.J., and van der Wielen, L.A.M. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71,** 1–12.
[٢٤] Varma, A.J., Kennedy, J.F., and Galgali, P. (2004) *Carbohydr. Polym.* **56,** 429–445.

[٢٥] Riva, S. (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5,** 106–111.

[٢٦] Khimiuk, A.Y., Korennykh, A.V., van Langen, L.M., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., and Švedas, V.K. (2003) *Tetrahedron Asymmetry*, **14,** 3123–3128.

[٢٧] Zhou, Y.-Y., Yang, T., Wang, N., Xua, L., Huang, Y.-B., Wu, X.-X., Yang, X.-C., and Zhang, X.-Z. (2003) *Enzyme Microb. Technol.*, **33,** 55–61.

[٢٨] Ishige, T., Honda, K., and Shimizu, S. (2005) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9,** 174–180.

[٢٩] Liljeblad, A. and Kanerva, L.T. (2006) *Tetrahedron*, **62,** 5831–5854.

[٣٠] Cai, X., Wang, N., and Lin, X. (2006) *Polymer*, **47,** 6491–6495.

[٣١] Konarzycka-Bessler, M. and Jaeger, K.-E. (2006) *Trends Biotechnol.*, **24,** 248–250.

[٣٢] McNamara, C.J. and Mitchell, R. (2005) *Front. Ecol. Environ.*, **3,** 445–451.

[٣٣] Kirk, O., Borchert, T.V., and Fuglsang, C.C. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13,** 345–351.

[٣٤] Duetz, W.A., van Beilen, J.B., and Witholt, B. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12,** 419–425.

[٣٥] Groves, J.T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A.*, **100,** 3569–3574.

[٣٦] Arnold, F.H. and Glieder, A. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 567–569.

[٣٧] Zhao, H. and van der Donk, W.A. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 583–589.

[٣٨] Nazor, J. and Schwaneberg, U. (2006) *ChemBioChem*, **7,** 638–644.

[٣٩] Hollmann, F., Lin, P.-C., Witholt, B., and Schmid, A. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125,** 8209–8217.

[٤٠] Yasohara, Y., Kizaki, N., Hasegawa, J., Takahashi, S., Wada, M., Kataoka, M., and Shimizu, S. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51,** 847–851.

[٤١] Yang, Z.-H., Yao, S.-J., and Lin, D.-Q. (2004) *Ind. Eng. Chem.Res.*, **43,** 4871–4875.

[٤٢] Doswald, S., Hanlon, S.P., and Kupfer, E. (2007) US Patent Application 0009999 A1.

[٤٣] Csuk, R. and Glaenzer, B.I. (1991) *Chem. Rev.*, **91,** 49–97.

[٤٤] Michielsen, M.J.F., Meijer, E.A., Wijffels, R.H., Tramper, J., and Beeftink, H.H. (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, **22,** 621–628.

[٤٥] Doig, S.D., Simpson, H., Alphand, V., Furstoss, R., and Woodley, J.M. (2003) *Enzyme Microb. Technol.*, **32,** 347–355.

[٤٦] Fontanille, P. and Larroche, C. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60,** 534–540.

[٤٧] Chen, R.R. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74,** 730–738.

[٤٨] Ni, Y. and Chen, R. (2005) *Biotechnol. Prog.*, **21,** 799–805.

[٤٩] Sedlaczek, L., Lisowska, K., Korycka, M., Rumijowska, A., Ziółkowski, A., and Długoński, J. (1999) *Appl. Microbiol. Bio-technol.*, **52,** 563–571.

[٥٠] Rumijowska-Galewicz, A., Ziółkowski, A., Korycka-Machała, M., and Sedlaczek, L. (2000) *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **16,** 237–244.

[٥١] Korycka-Machała, M., Ziółkowski, A., Rumijowska-Galewicz, A., Lisowska, K., and Sedlaczek, L. (2001) *Microbiology*, **147,** 2769–2781.

[٥٢] Ni, Y., Mao, Z., and Chen, R.R. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73,** 384–393.

[٥٣] Sroga, G.E. and Dordick, J.S. (2002) *Biotechnol. Bioeng.*, **78,** 761–769.

[٥٤] Huang, Q., Huang, K., and Scott, A.I. (1998) *Tetrahedron Lett.*, **39,** 2033–2036.

[٥٥] Otto, R.T., Bornscheuer, U.T., Syldatk, C., and Schmid, R.D. (1998) *Biotechnol. Lett.*, **20,** 437–440.

[٥٦] Tischer, W. and Wedekind, F. (1999) *Immobilized Enzymes: Methods and Applications, in Biocatalysis: from Discovery to Application. Topics in current Chemistry*, vol. 200, Springer-Verlag, Berlin, pp. 95–126.

[٥٧] Krajewska, B. (2004) *Enzyme Microb. Technol.*, **35,** 126–139.

[٥٨] Sheldon, R.A., Schoevaart, R., and Van Langen, L.M. (2005) *Biocatal. Biotransformation*, **23,** 141–147.

[٥٩] Puri, M., Kaur, H., and Kennedy, J.F. (2005) *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **80,** 1160–1165.

[٦٠] Coppens, G. (1982) US Patent 4345031.

[٦١] Tsakiris, A., Kourkoutas, Y., Dourtoglou, V.G., Koutinas, A.A., Psarianos, C., and Kanellaki, M. (2006) *J. Sci. Food Agric.*, **86,** 539–543.

[٦٢] Plessas, S., Bekatorou, A., Koutinas, A.A., Soupioni, M., Banat, I.M., and Marchant, R. (2007) *Bioresour. Technol.*, **98,** 860–865.

[٦٣] Davis, B.G. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 379–386.

[٦٤] Pierre, A.C. (2004) *Biocatal. Biotransformation* , **22,** 145–170.

[٦٥] Avnir, D., Coradin, T., Lev, O., and Livage, J. (2006) *J. Mater. Chem.*, **16,** 1013–1030.

[٦٦] Noritomi, H., Sasanuma, A., Kato, S., and Nagahama, K. (2007) *Biochem. Eng. J.*, **33,** 228–231.

[٦٧] Kim, J., Grate, J.W., and Wang, P. (2006) *Chem. Eng. Sci.*, **61,** 1017–1026.

[٦٨] Wang, P. (2006) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17,** 574–579.

[٦٩] Bruns, N. and Tiller, J.C. (2005) *Nano Lett.*, **5,** 45–48.

[٧٠] Torres, S. and Castro, G.R. (2004) *Food Technol. Biotechnol.*, **42,** 271–277.

[٧١] Kragl, U., Eckstein, M., and Kaftzik, N. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13,** 565–571.

[٧٢] Jain, N., Kumar, A., Chauhan, S., and Chauhan, S.M.S. (2005) *Tetrahedron*, **61,** 1015–1060.

[٧٣] Knez, Ž. and Habulin, M. (2002) *J. Supercritical Fluids*, **23,** 29–42.

[٧٤] Knez, Ž., Habulin, M., and Primožič, M. (2005) *Biochem. Eng. J.*, **27,** 120–126.

[٧٥] Lamare, S. and Legoy, M.-D. (2004) US Patent 6511842.

[٧٦] Zijlstra, G.M., de Gooijert, C.D., and Tramper, J. (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9,** 171–176.

[٧٧] Illanes, A., Wilson, L., Altamirano, C., Cabrera, Z., Alvarez, L., and Aguirre, C. (2007) *Enzyme Microb. Technol.*, **40,** 195–203.

[٧٨] Karakatsanis, A. and Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007) *J. Food Eng.*, **80,** 1213–1217.

[٧٩] Blattner, C., Zoumpanioti, M., Krönera, J., Schmeer, G., Xenakis, A., and Kunza, W. (2006) *J. Supercritical Fluids*, **36,** 182–193.

[٨٠] Bühler, B., Straathof, A.J.J., Witholt, B., and Schmid, A. (2006) *Org. Proc. Res. Develop.*, **10,** 628–643.

[٨١] Gravil, S., Veschambre, H., Ch ê nevert, R., and Bolte, J. (2006) *Tetrahedron Lett.*, **47,** 6153–6157.

[٨٢] Katsoura, M.H., Polydera, A.C., Tsironis, L., Tselepis, A.D., and Stamatis, H. (2006) *J. Biotechnol.*, **123,** 491–503.

[٨٣] Pfruender, H., Jones, R., and Weuster-Botz, D. (2006) *J. Biotechnol.*, **124,** 182–190.

[٨٤] Yuan, Y., Bai, S., and Sun, Y. (2006) *Food Chem.*, **97,** 324–330.

[٨٥] Debeche, T., Marmet, C., Kiwi-Minsker, L., and Renken, A. (2005) *Enzyme Microb. Technol.*, **36,** 911–916.

[٨٦] Erable, B., Maugard, T., Goubet, I., Lamare, S., and Legoy, M.D. (2005) *Process Biochem.*, **40,** 45–51.

[٨٧] Kumar, R., Modak, J., and Madras, G. (2005) *Biochem. Eng. J.*, **23,** 199–202.

[٨٨] Garcia, S., Lourenço, N.M.T., Lousa, D., Sequeira, A.F., Mimoso, P., Cabral, J.M.S., Afonso, C.A.M., and Barreiros, S. (2004) *Green Chem.*, **6,** 466–470.

[٨٩] Hilker, I., Alphand, V., Wohlgemuth, R., and Furstoss, R. (2004) *Adv. Synth. Catal.*, **346,** 203–214.

[٩٠] Staebler, A., Cruz, A., van der Goot, W., Pinheiro, H.M., Cabral, J.M.S., and Fernandes, P. (2004) *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **29,** 19–23.

[٩١] Kim, M.-J., Choi, M.Y., Lee, J.K., and Ahn, Y. (2003) *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **26,** 115–118.

[٩٢] Liao, L.-C., Ho, C.S., and Wu, W.-T. (1999) *Process Biochem.*, **34,** 417–420.

[٩٣] Straathof, A.J.J. (2003) *Biotechnol. Prog.*, **19,** 755–762.

[٩٤] Kim, P.-Y., Pollard, D.J., and Woodley, J.M. (2007) *Biotechnol. Prog.*, **23,** 74–82.

[٩٥] Hill, A.C. (1898) *J. Chem. Soc.*, **73,** 634–658.

[٩٦] Kastle, J.H. and Loevenhart, A.S. (1900) *Am. Chem. J.*, **24,** 491–525.

[٩٧] Sym, E.A. (1936) *Biochem. J.*, **30,** 609–617.

[٩٨] Halling, P.J. and Kvittingen, L. (1999) *Trends Biotechnol.*, **17,** 343–344.

Obeikandl.com

[٩٩] Stamatis, H., Xenakis, A., and Kolisis, F.N. (1999) *Biotechnol. Adv.*, **17,** 293–318.

[١٠٠] Aloulou, A., Rodriguez, J.A., Fernandez, S., van Oosterhout, D., Puccinelli, D., and Carrière, F. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1761,** 995–1013.

[١٠١] Fernandes, P., Ferreira, B.S., and Cabral, J.M.S. (2003) *Int. J. Antimicrob. Agents*, **22,** 211–216.

[١٠٢] Filho, M.V., Stillger, T., M ü ller, M., Liese, A., and Wandrey, C. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42,** 2993–2996.

[١٠٣] Barberis, S., Quiroga, E., Morcelle, S., Priolo, N., and Luco, J.M. (2006) *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **38,** 95–103.

[١٠٤] Schmid, A., Kollmer, A., Mathys, R.G., and Witholt, B. (1998) *Extremophiles*, **2,** 249–256.

[١٠٥] Park, S. and Kazlauskas, R.J. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 432–437.

[١٠٦] Kaar, J.L., Jesionowski, A.M., Berberich, J.A., Moulton, R., and Russell, A.J. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125,** 4125–4131.

[١٠٧] Lutz-Wahl, S., Trost, E.-M., Wagner, B., Manns, A., and Fischer, L. (2006) *J. Biotechnol.*, **124,** 163–171.

[١٠٨] Lo, C.-K., Pan, C.-P., and Liu, W.-H. (2002) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **28,** 280–283.

[١٠٩] Lamare, S., Legoy, M.-D., and Graber, M. (2004) *Green Chem.*, **6,** 445–458.

[١١٠] Oliveira, D., Feihrmann, A.C., Rubira, A.F., Kunita, M.H., Dariva, C., and Oliveira, J.V. (2006) *J. Supercritical Fluids*, **38,** 373–382.

[١١١] Bühler, B., Witholt, B., Hauer, B., and Schmid, A. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, **68,** 560–568.

[١١٢] Sengupta, S. and Modak, J.M. (2001) *Chem. Eng. Sci.*, **56,** 3315–3325.

[١١٣] Braiuca, P., Ebert, C., Basso, A., Linda, P., and Gardossi, L. (2006) *Trends Biotechnol.*, **24,** 419–425.

[١١٤] Haaland, P.D. (1989) *Experimental Design in Biotechnology*, Marcel Dekker Inc, New York.

[١١٥] Braiuca, P., Ebert, C., Fischer, L., Gardossi, L., and Linda, P. (2003) *ChemBioChem*, **4,** 615–622.

[١١٦] Braiuca, P., Cruciani, G., Ebert, C., Gardossi, L., and Linda, P. (2004) *Biotechnol. Prog.*, **20,** 1025–1031.

[١١٧] Szita, N., Boccazzi, P., Zhang, Z., Boyle, P., Sinskey, A.J., and Jensen, K.F. (2005) *Lab Chip*, **5,** 819–826.

[١١٨] Betts, J.I. and Baganz, F. (2006) *Microb. Cell Fact.*, **5,** 21–34.

[١١٩] Fernandes, P. and Cabral, J.M.S. (2006) *Biocatal. Biotransformation*, **24,** 237–252.

[١٢٠] Büchs, J., Lotter, S., and Milbradt, C. (2001) *Biochem. Eng. J.*, **7,** 135–141.

[١٢١] Büchs, J. (2001) *Biochem. Eng. J.*, **7,** 91–98.

[١٢٢] Maier, U., Losen, M., and Büchs, J. (2004) *Biochem. Eng. J.*, **17,** 155–167.

[١٢٣] Doig, S.D., Pickering, S.C.R., Lye, G.J., and Baganz, F. (2005) *Chem. Eng. Sci.*, **60,** 2741–2750.

obeikandl.com

obeikandl.com

الفصل السابع

تقنية النانو الحيوية
NANOBIOTECHNOLOGY

رودي كووبمانز
Rudy J. Koopmans

(١ ,٧) تجهيز المسرح Setting the Stage

حدث تحولٌ كبيرٌ في أواخر القرن الثامن عشر وأوائل القرن التاسع عشر في الظروف التقنية، والاجتماعية والاقتصادية، والثقافية، والمعروف بالثورة الصناعية. تم استبدال العمل اليدوي بالماكينات، وانتجت السلع بكميات كبيرة. وقد تم تسهيل التوزيع والنقل بواسطة القنوات التي بنيت حديثاً، والطرق والسكك الحديدية المحسنة. وحفزت الحاجة المتزايدة للمنتجات الطبيعية البحوث في المواد الخام والمواد البديلة.

فـي مجال العلوم تم الاتفاق عموماً على أن المواد العضوية التي تم الحصول عليها من النباتات والحيوانات لا يمكن إنشاؤها في المختبر؛ ويمكن فقط أن يتم عزلها وفحصها، وربما تحليلها إلى مواد أبسط. وكان العكس، إنتاج المعقد من البسيط، وراء الكفاءة البشرية. هذا كان من عمل الخالق، أو من قوة الحياة التي تعمل داخل المنظومات الحية [١].

ولاحقاً بعد أكثر من نصف قرن تقريباً، في عام ١٨٥٨م، حدد أرشيبالد سكوت كوبر [٢] التكافؤ الرباعي لذرة الكربون، وفي عام ١٨٦٥م نشر فريدريك أوجست كيكولي بحثه على الحلقة السداسية لجزيء البنزين [٣]. والآن تم تطوير لغة في مقياس النانو (أي الجزيئات) وتم تخصيص اسم ورسم منفصلين لكل مركب عضوي. وفجأة، تم تخليق آلاف من المواد الجديدة في المختبر. وأصبح علم الكيمياء تقريباً فريداً من نوعه بين العلوم في خلق الكثير من عالم المواد. وتمت ولادة الصناعة الكيميائية.

وبعد حوالي ١٥٠ سنة في بداية القرن الحادي والعشرين، بدا أن سيناريو مماثل يتطور. فالمواد الخام البديلة والمواد المبتكرة يتم فحصها في محاولة لخلق مجتمع أكثر استدامة. في الوقت الحاضر تتواجد أرضية علمية أفضل بكثير. تتوفر معدات أكثر تعقيداً للتحقيق في عالم الجزيئات، عالم النانو (١٠$^{-٩}$ متر). وتعود الباحثون على التفكير

مثل الطبيعة. وتم إدراك أن التركيب يمكن بناؤه من مقياس النانو إلى المقياس الكبير في الخبرة اليومية، أي: "من القاعدة إلى القمة" [٤، ٥].

ويجري الآن بناء المواد والأجهزة من المكونات الجزيئية، والتي تجمع أنفسها كيميائياً باستخدام مبادئ التعرف الجزيئي. ويمكن تحقيق مزيد من الدقة والأداء الوظيفي أحسن من نهج التجميع "من أعلى إلى أسفل"، حيث يتم بناء مركبات النانو من كيانات أكبر دون التحكم على مستوى الذرة. ومع ذلك، لا يزال العلم يحاول فهم القواعد الأساسية لتكوين الهيكل والوظيفة من أجل أن تطبقها التقنية. والتحديات كثيرة، مما يتطلب مناهج متعددة التخصصات حيث إن تعقيدها يكون جوهرياً.

ورغم أن جميع التعريفات هي تكرار للمعنى (أي زائدة عن الحاجة)، فإنها قد تكون لا تزال مفيدة في ترسيم الحدود بين التخصصات الحقيقة لتسمح لنا بجمع المعرفة التفصيلية. وعليه يمكن رؤية موضوع التقنية الحيوية النانوية على أنها فرع من فروع تقنية النانو التي تركز على التطبيقات أو الاستخدامات الحيوية والحيوية الكيميائية.

تغطي تقنية النانو مجالً واسعاً من العلوم والتقنيات. والموضوع الموحد هو التحكم في المادة على نطاق أصغر من واحد ميكرومتر (١٠$^{-٦}$ متر)، وكذلك تصنيع الأجهزة في مثل هذا المقياس [٦، ٧].

وفقاً لاتفاقية الأمم المتحدة بشأن التنوع الحيوي، تعني التقنية الحيوية: "أي تطبيق تقني يستخدم النظم الحيوية، أو الكائنات الحية أو مشتقاتها، لصنع أو تغيير منتجات أو عمليات من أجل استخدام معين [٨].

وتصل تقنية النانو أكثر تخصصاً إلى المركبات والآلات النانوية المصممة عن طريق ٣,٨ مليارات السنين من الانتقاء الطبيعي؛ وتحديداً، آلات الخلية والجزيئات الحيوية (أي الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي، والحمض النووي الريبوزي، والأدينين ثلاثي الفوسفات، والدهون، والبروتينات، والسكريات).

ويعدُّ استغلال السلوكيات والخصائص الوظيفية ذاتية التنظيم لهذه الجزيئات الحيوية والعمليات الخلوية هو المسار نحو الأمام لإنجاز الكثير من الأهداف الاجتماعية والتي هي من الصعب أو المستحيل تحقيقها بوسائل أخرى. وهذا يتطلب اتباع نهج متعدد التخصصات ذي معرفة كبيرة في مجالات الأحياء، والكيمياء، والطب، والرياضيات، والفيزياء، وعلم البيئة، وعلم النفس، وعلم الاجتماع، والكثير من التخصصات الهندسية.

(٧,٢) المنظور الصناعي Industrial Prespective

إن الابتكار أو على وجه التحديد تجديد عروض المنتج التي تناسب الاحتياجات المجتمعية -أي "السلع" المسلمة إلى أشخاص على استعداد لدفع ثمن- يكون ضرورياً لجعل النشاط الاقتصادي مستدام (ملاحظة: يمكن أن تكون "السلع" أي شيء قابل للتداول في معاملة اقتصادية متراوحة من المواد الخام إلى إنتاج خدمات). وهناك

بعض التشابه مع عملية الانتقاء الطبيعي، وتطبق في هذه الحالة على الأنظمة، أي منظمات الأشخاص المسماة بالشركات. في الشركات يأتي الناس معاً حول قضية مشتركة تسعى إلى البقاء على قيد الحياة وإدامة السبب. وسوف تحافظ الشركات على نفسها إذا تكيفت "ذاكرتها" –وحدة المعلومات الثقافية القابلة للنقل من عقلٍ إلى آخر– مع المتطلبات البيئية المتغيرة [٩، ١٠].

وتكون التحديات الرئيسة في هذه العملية الاقتصادية التطورية هي تعريف ماهية تلك السلع وكيف بالضبط يمكن تسليمها تحت الضغوط التي تواجهها الشركات. و"ماهية" هي مستوحاة غالباً من قبل السوق و"روح العصر". وذات مرة كان استخلاص البضائع من الطبيعة والتخلص منها بعد حياة مفيدة دون كثيرٍ من التفكير من الممارسات المقبولة. أما الآن فيجب أن يتم إعادة تدوير السلع نفسها أو استبدالها بسلعٍ لها بصمة بيئية صغيرة جداً (المعرفة بأنها مساحة الأرض اللازمة لتوفير الموارد، أي الحبوب والأعلاف والخشب، والأسماك، والأراضي الحضرية، وتمتص الانبعاثات، أي ثاني أكسيد الكربون أو ما يعادله [١١]). وترتبط "الكيفية" بالموارد المطلوبة من حيث الأشخاص والأموال، وحالة التقنية والوقت لجلب البضائع إلى السوق. وهي تشمل عملية إدامة سبب التكيف للشركات.

وكاتجاه صناعي، ينبغي النظر إلى التقنية الحيوية النانوية ككيفية في هذا السياق. وهي لا تزال اليوم نشاطاً مدفوعاً بصورةٍ أساسية من قبل الأكاديميين باستثناء عدد قليل من الشركات البادئة تقدر بنحو ١٥٠ في جميع أنحاء العالم [١٢]. وقد تبنت الشركات الطبية والدوائية هذا الاتجاه على الأرجح مبكراً. والتحدي الرئيس في نتائج التجارب السريرية الناجحة هو صياغة موقف السوق. وقد تكون هناك عقبات إضافية في قطاعاتٍ أخرى من الصناعة تتعلق بالتشريعات التنظيمية والقبول الاجتماعي والاقتصادي.

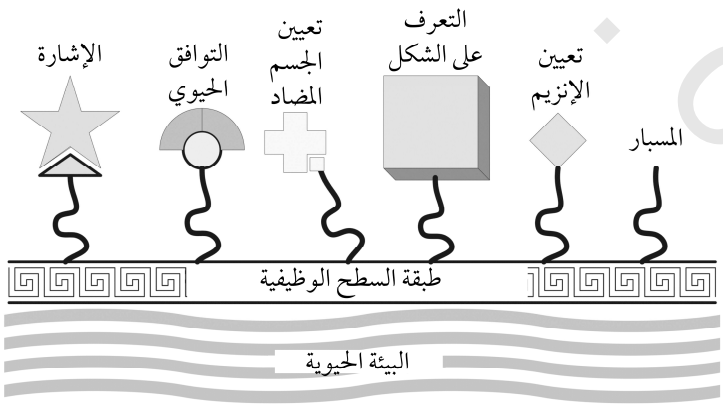
مهما كان العلم رائعاً، فسوف يستغرق وقتاً طويلاً ليصل إلى مستوى نشاط اقتصادي رئيس. ويعتمد طول هذه الفترة على العلم والتطورات التقنية المفاجئة والمعرفة المرتبطة بها. ولذلك فالكتابة عن الجوانب الصناعية للتقنية الحيوية النانوية هي بشكلٍ افتراضي محدودة لمخيلة علماء هذا اليوم كما يذكر في المراجع. وتبقى فقط محاولة غير متعبة لإلهام الباحثين وأي طرف معني آخر لإيجاد طريق لتعلم وتطبيق الدروس المستخلصة من الطبيعة. ومع ذلك، فإن الجهود البحثية تسير بخطى سريعة حيث إنه يوجد "الكثير من المساحة في القاع" [١٣].

(٧,٣) تقنية النانو في علم الأحياء والكيمياء الحيوية Nanotechnology in Biology and Biochemistry

على الرغم من أن الجسيمات النانوية لا تندرج بالضرورة تحت تعريف التقنية الحيوية النانوية وما يرتبط بها من التطبيقات إلا أن هناك بالتأكيد بعض التداخل. ونشأ الشطط المهم للتقنية الحيوية النانوية في ابتكار المواد من

دراسة الجسيمات ذات حجم النانو، ٥ نانومتر وأكبر [١٤، ١٥]. في هذه الأبعاد يمكن أن تتفاعل الجسيمات البوليمرية (التخليقية) (على سبيل المثال، البوليسترين)، والسيراميكية (على سبيل المثال، الطين)، أو المعدنية (مثل الفضة والذهب) من خلال القوى بين الجزيئية مع جزيئات أخرى تضم الخلية الحية أو الجزيئات الحيوية. وكان المفهوم هو ربط جسيم في حجم النانو إلى جزيئات حيوية واستغلال إما وظيفية الجسيمات (على سبيل المثال، الفضة كعامل مضاد للميكروبات) وإما الجزيء الحيوي (على سبيل المثال، الأجسام المضادة، أو البروتينات السكرية المذابة، أي الجزيئات الحيوية المكونة من بروتين وكربوهيدرات (سكر أحادي)) (الشكل رقم ١, ٧). وقد تم استكشاف الكثير من التطبيقات [١٦-٣٠]، بما في ذلك:

- المعلمات الحيوية المستشعة.
- توزيع الدواء والجينات.
- الكشف الحيوي عن مسببات الأمراض.
- الكشف عن البروتينات.
- التحقق من تركيب الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي.
- الهندسة النسيجية.
- تدمير الورم عن طريق التسخين (ارتفاع الحرارة).
- فصل وتنقية الجزيئات الحيوية والخلايا.
- تعزيز النقيض باستخدام الرنين المغناطيسي.
- العلاج بالفيروس البكتيري (بدائل للمضادات الحيوية).



الشكل رقم (١, ٧). تمثيل مبسط للوظائف الممكنة الناجمة خلال ربط الجسيمات النانوية لوسائط التفاعل الجزيئية الحيوية أو من مسبار جزيئي حيوي للجسيمات، مرتبط بطبقة سطحية نشطة حيوياً.

obeikandl.com

(٧ ,٤) محاكاة الطبيعة Biomimicry

محاكاة الطبيعة [٣١] هي ترجمة من اللغة اليونانية. ومحاكاة الطبيعة هي كل محاولة لإعادة إنتاج ما حققته الطبيعة بالفعل. وهي متعلقة بالتقنية الحيوية النانوية؛ لأنها تنطوي على فهم بنية وعمليات الطبيعة. وقد تسمح الرؤي على المستوى الجزيئي عند ذلك بنهج القاعدة–القمة لتقليد الطبيعة إما باستخدام المكونات البنائية نفسها أو المكونات الشبيهة بها. وقد أصبح هذا الموضوع مجالاً مهماً للبحث، ولا يزال عدد المواد والعمليات والمنتجات القائمة على الأمثلة يزداد في التوسع. على سبيل المثال، في مجال المواد تم تعلم عدة دروس من الطبيعة [٣٢]:

- السيراميكيات المستوحاة من أذن البحر.
- المواد اللاصقة المستوحاة من بلح البحر الأزرق.
- اللون خالي الصبغة المستوحى من الفراشة.
- حصاد المياه المستوحى من الخنفساء.
- استبدال محفزات البلاتين في خلايا الوقود المستوحاة من الميكروبات.
- تصنيع السيليكون المستوحى من الدياتومات والإسفنج.
- تخزين اللقاحات المستوحى من نزع الماء.

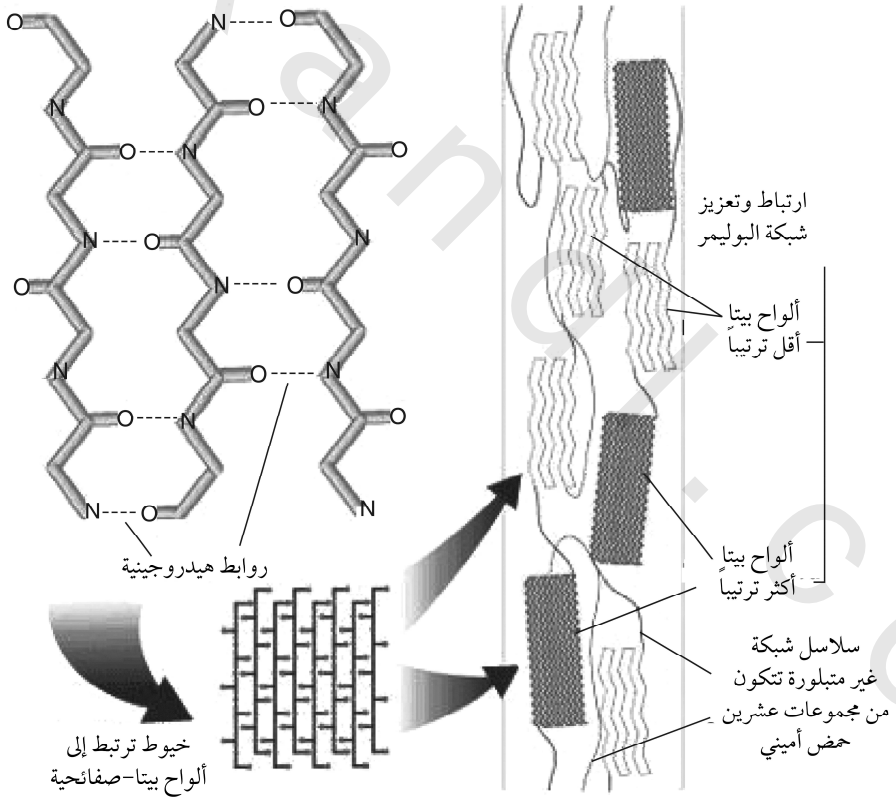
(١ ,٤ ,٧) ألياف الحرير Silk Fibers

إن حرير العنكبوت هو على الأرجح واحد من أكثر المواد الحيوية المرغوبة. وهذه الألياف لديها ميزة كونها خفيفة ومرنة. وعلى أساس الوزن للوزن فهي تقريباً أقوى ثلاث مرات من الفولاذ: قوة الشد للألياف القطرية لحرير العنكبوت تكون حوالي ١ ,١ جيجا باسكال، في حين أنها بالنسبة للفولاذ ٠ ,٤ جيجا باسكال [٣٣، ٣٤]. تنتج العناكب الكثير من الأنواع المختلفة من الحرير [٣٥] ولكن الأكثر دراسة هو حرير الأمبولات الرئيس، الذي يشكل إطار خيط الجذب والشبكة. وحيث إنه يعدُّ من غير العملي تربية العناكب وحصاد الحرير منها فقد ركزت البحوث على فهم بروتينات الحرير وعملية التجميع الذاتي لتكوين الألياف. وتم باستخدام تقنية الحمض النووي المؤتلف إنتاج عدد من البروتينات الشبيهة بحرير العنكبوت. وإلى جانب التركيب الأساسي والثانوي لبروتين الحرير، فإنه يتم تحديد خصائص الألياف بظروف التحضير [٣٦–٤١]. وأصبح الآن من الممكن إنتاج ألياف قوية صناعياً باستخدام بروتينات الحرير المؤتلفة والمجددة. وهناك شركتان لديهما الكثير من الجهود لإنتاج حرير العنكبوت الصناعي، نكسيا للتقنيات الحيوية المحدودة (www.nexiabiotech.com) في كندا وسبنتيك للهندسة (www.spintec-engineering.de) في ألمانيا. ويمكن لهذه التقنية أن تجد تطبيقات في مجال الطب، باعتبارها شكلاً جديداً من الأوتار الصناعية المتينة، والأربطة، والأطراف. ويمكن أيضاً استخدام حرير العنكبوت للمساعدة في إصلاح الأنسجة، والتئام الجروح،

obeikandl.com

وتضميد الجراح، وعمل غرز رقيقة للغاية قابلة للتحلل لجراحات المخ والأعصاب أو العيون، وكذلك استخدامها كبديل للألياف الصناعية.

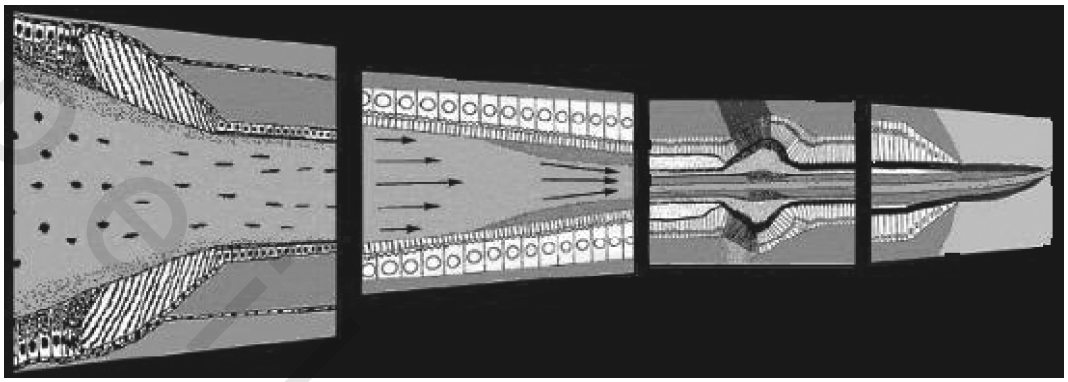
وترجع الخصائص الرائعة لحرير العنكبوت إلى تركيبه الجزيئي الفريد من نوعه (الشكل رقم ٢, ٧). وقد أظهرت دراسات حيود الأشعة السينية أن الحرير يتألف من الحرير من سلاسل طويلة من الأحماض الأمينية التي تشكل بلورات البروتين [٤٢]. تحتوي غالبية أنواع الحرير (حرير مختلف العناكب ودودة الحرير) أيضاً على بلورات ورقية مطوية في الوضع بيتا والتي تكون جنباً إلى جنب سلاسل أحماض أمينية متكررة تتألف من ٨–١٠ مجموعات غنية بالألانين و٢٤–٣٥ مجموعة غنية بالجليسين الطرفي. وتربط بلورات بيتا المطوية الناتجة الفيبروينات إلى شبكة بوليمرية ذات صلابة كبيرة، وقوة، ومتانة. وقد تم تضمين هذا المكون البلوري في مكون مطاطي يسمح بالتمدد، ويتألف من سلاسل شبكية غير متبلورة ذات أطوال من ١٦–٢٠ من مجموعات الأحماض الأمينية. وهذا التمدد وقوة الشد، جنباً إلى جنبٍ مع الوزن الضئيل هو الذي يحمي الشبكة من التمزق؛ نتيجة الرياح وتمنع نزع نقاط تثبيتها.



الشكل رقم (٢, ٧). تمثيل هيكل خيط من الحرير يظهر هيكل بقايا الأحماض الأمينية الأساسية وصفائح البيتا المطوية والتي ترتبط في نهاية المطاف بجزيئات اليفبروين المتعددة.

المصدر: (٢٠٠٩م) http://www.scq.ubc.ca/biomimicrybimimetics-general-principles-and-practical-examples/

وتكون تقنية المعالجة أمر بالغ الأهمية لتحويل الهياكل الأساسية والثانوية إلى ألياف حقيقية. وهي تشمل التجمع الذاتي ذا التحكم الأيوني للبروتينات الفردية خلال قذف محلول. كما أن شكل المحقن ومعدل القذف يكونا بالغا الأهمية لمحاذاة البروتينات وحث المرحلة الفاصلة لتكوين الألياف (الشكل رقم ٣, ٧).



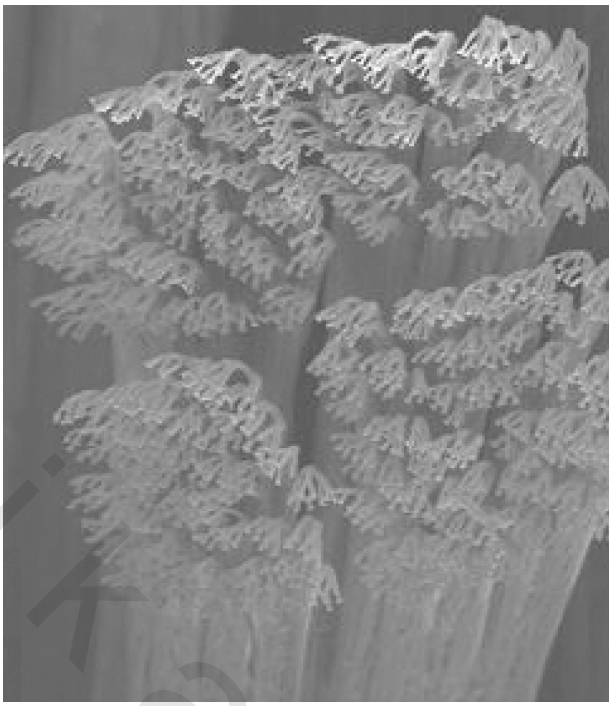
الشكل رقم (٣, ٧). تخطيط توضيحي لقناة الغزل لإنتاج الحرير بواسطة عنكبوت الأورب نيفيلا. ويوضح تركيب منطقة الألياف والتي تحث الإستطالة السريعة فيها المحاذاة الجزيئية، ومرحلة الفصل، وتكوين الألياف.

المصدر: Vollrath, D. Knight, *Nature* 2001, 410:541-548

وقد ألهم فهم التركيب الأساسي لحرير العنكبوت العلماء لإعادة إنتاج صفائح البيتا ذات سلسلة خاصة من الأحماض الأمينية الألانين-الجليسين، ودمجها مع سلسلة صناعية من أوليجوميرات البولي إيثيلين جليكول [٤٣، ٤٤]. وهذه الأخيرة تمنع التجمع الكامل لصفائح البيتا وتولد تركيبات ليفات مماثلة لحرير العنكبوت كما هو موضح في الشكل رقم (٢, ٧). ويمكن أن تؤدي هذه الأساليب الهجينة من البتيدات المجمعة أو أوليجوميرات المواد العضوية الحيوية الأخرى مع البوليمرات الصناعية إلى هياكل مصممة بعقلانية وخصائص مواد مصممة.

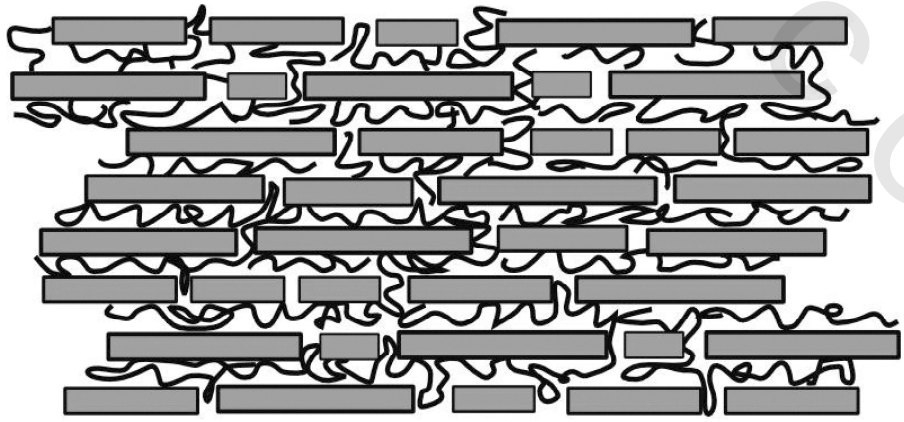
(٢, ٤, ٧) لاصقات أبو بريص Gecko Adhesives

إن الرجل العنكبوت، الشخصية الكارتونية العجيبة التي صممها ستان لي وستيف ديتكو في ١٩٦٢م، لديه القدرة على استخدام خيوط حرير العنكبوت للتأرجح بين المباني المرتفعة والتمسك وتسلق أي سطح. تم تحويل قدرات الخيال العلمي هذه إلى واقعٍ ملموس من خلال تصميم التقنيات لمحاكاة المبادئ اللاصقة المستخدمة من سحالي أبو بريص [٤٥]. وتعتمد قدرتها على الالتصاق بأي سطح تقريباً على شعيرات الكيراتين الدقيقة جداً (تحت مستوى الميكرون) التي تغطي باطن أقدامها (الشكل رقم ٤, ٧). وتنتج كل شعرة قوة ضئيلة من حوالي $١٠^{-٧}$ نيوتن من خلال قوى فان دير فال والتفاعلات الشعرية، ولكن الملايين من الشعيرات التي تعمل معاً تولد قوة التصاق هائلة من ١٠ نيوتن/ سم^{٢} [٤٦].



الشكل رقم (٤ ,٧). تحليلات المجهر الإلكتروني لهيكل شعيرات أبو بريص، مشيراً إلى تكوينها من مجاميع من ليفات بروتينية مرتبطة معاً عن طريق مصفوفة ومحاطة بغمد بروتيني محدد [٤٩].

وقد طور باحثون في جامعة مانشستر [٤٧] وجامعات أخرى تقنيات لإعادة إنتاج شكل وحجم شعيرات أبو بريص توفر فرص للالتصاق العكسي دون لاصق أو أسطح عالية الاحتكاك لدعم الأحمال على الأسطح الملساء. ومن أجل هذه الأخيرة فقد عبأ المهندسون في جامعة كاليفورنيا، بيركلي ٤٢ مليون ليفة لكل سنتيمتر مربع معاً، كل منها تصل إلى مجرد ٢٠ ميكروميتر في الطول و ٠,٦ ميكروميتر فر القطر [٤٨].



الشكل رقم (٥ ,٧). توضيح لتركيب حيوي مثل الصدف، يتميز بطبقات صفائح الأراجونيت بين البوليمرات العضوية.

(٣, ٤, ٧) الصدف والترسيب الحيوي للمعادن Nacre and Biomineralization

الصدف، والمعروف أيضاً باسم أم اللؤلؤ، هو تركيب عضوي-غير عضوي يتواجد بشكلٍ طبيعي. وهو يتكون من صفائح سداسية من الأراجونيت (بلورات كربونات الكالسيوم) والتي يصل عرضها إلى ١٠-٢٠ ميكروميتر و٠,٥ ميكروميتر في السمك، تترتب في صفائح متوازية مستمرة. ويتم فصل طبقات الصفائح عن طريق ورقات من البوليمرات الحيوية المرنة مثل الكيتين، وهو سكر معقد، أو البروتينات الشبيهة بالحرير (الشكل رقم ٧,٥). ويجعل هذا الخليط من الصفائح الهشة والطبقات الرقيقة من البوليمرات الحيوية المرنة المادة قوية ومرنة، وتبلغ متانتها مرتين ضعف السيراميكيات عالية التقنية. وتمنح القوة والمرونة من قبل ترتيب "القرميد" للصفائح، مما يعوق انتشار الشقوق العرضية ويسمح للمادة بالانزلاق تحت قوة الضغط. وقد قام الكثير من المجموعات البحثية بمحاكاة تركيب الصدف بهدف إنتاج مواد خفيفة الوزن وجامدة، وطلاءات لأجزاء الطائرات، والعظام الصناعية، والطلائات الشفافة المقاومة للتآكل.

وفي أحد الأساليب، تعطي الطبقات المتناوبة من الطين ومحلول مادة بولي إلكتروليت تقترب من خصائص الصدف من حيث القوة والمرونة [٥٠، ٥١].

وثمة نهج آخر يستفيد من عملية التجميع الذاتي لخلق تركيبات طبقية من المعدن/ البوليمر والتي تكون واضحة بصرياً ولكن أكثر متانة من الزجاج. وعلى عكس تقنيات القمة-القاع التقليدية، فإن هذه العملية منخفضة درجة الحرارة والمستحثة بالتبخير تسمح لمجموعات تكوين السائل بالتجميع الذاتي والتصلب إلى طلاءات يمكن استخدامها في الزجاج، وأجسام السيارات، والطائرات، أو أي شيء يحتاج إلى أن يكون خفيف الوزن ولكن مقاوم للكسر[٥٢، ٥٣].

كما قام باحثون آخرون بترسيب أفلام كربونات الكالسيوم من محاليل كربونات الكالسيوم المشبعة جداً عن طريق إضافة البولي ببتيدات المشحونة إليها [٥٤، ٥٥].

كل هذه الأساليب مستوحاة من خلال عملية الترسيب الحيوي للمعادن، والتي تنتج الكائنات الحية من خلالها المعادن، غالباً لتصلب أو تيبس الأنسجة الموجودة. ومن الأمثلة على ذلك السيليكات في الطحالب، والكربونات في الدياتومات واللافقاريات، وفوسفات الكالسيوم (الأباتيت) والكربونات (أراجونيت، الكالسيت) في الفقاريات. تشكل هذه المعادن عادةً سمات هيكلية مثل قواقع البحر والعظام في الثدييات، وتنتج في الظروف العادية المحيطة دون الحاجة لدرجات الحرارة المرتفعة، والضغوط، والمحاليل الكيميائية القوية، كما هو الحال بالنسبة للمعادن الصناعية [٥٦، ٥٧].

(٥ ,٧) المواد والمنتجات Materials and Products

(١ ,٥ ,٧) الببتيدات والبروتينات Peptides and Proteins

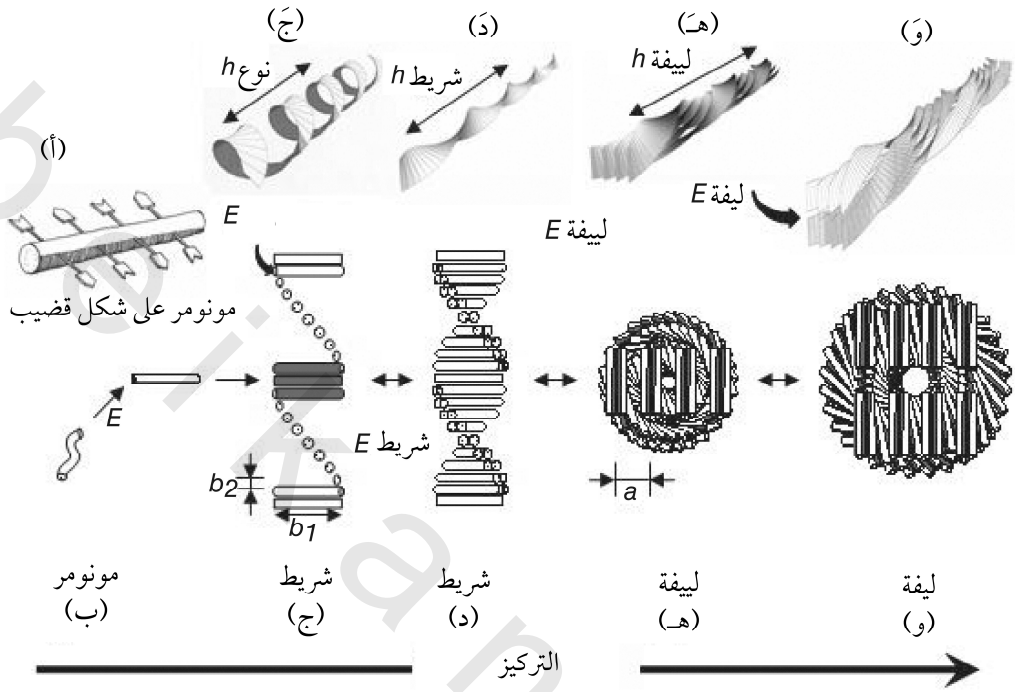
عادةً يشير مصطلح "الببتيد" إلى تسلسلات قصيرة نسبياً من مجموعات الأحماض الأمينية (<٥٠)، ويشير "البروتين" إلى البولي ببتيدات التي تتكون من تسلسلات أحماض أمينية أطول بكثير. ومع ذلك فإن هذا التقسيم يكون إلى حدٍ ما تعسفياً ويرتبط بالتسلسل التقريبي الأقل الذي يمكن تعبيره في الكائنات الحية الدقيقة أو الطول الأقصى الذي يمكن إنتاجه تخليقياً. وفقاً هذا العرف، يعدُّ الأنسولين (٥١ مجموعة أحماض أمينية) وبروتين البيتا اميلويد (٣٩-٤٣ مجموعات أحماض أمينية) المرتبطة بمرض الزهايمر من الببتيدات. وتميل البروتينات إلى أن تكون الحالة الوظيفية في الطبيعة بدلاً من التراكيب الأساسية والثانوية لمكونات سلاسل البولي ببتيدات.

وحيث إنه يتم تنظيم الكائنات الحية بالبروتينات، فقد بذلت جهود هائلة في الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية لفهم العلاقة بين تسلسل المونومر (التركيب الأساسي) والمراتب الأعلى من التنظيم من حيث التراكيب الثانوية (لوالب الألفا، وصفائح البيتا)، والثلاثية (تجميعات من التراكيب الثانوية في جزيء واحد)، والرباعية (تجميع الجزيئات المتعددة). وفي الواقع تتمكن البروتينات من خلال تغيير شكلها من أداء مجموعة متنوعة من الوظائف، بما في ذلك حركة العضلات، والارتباط الجزيئي، والحفز الإنزيمي، والتمثيل الغذائي، والنقل. وينتج التركيب الفعال للبروتين الحيوي من مختلف التفاعلات التي تشمل تفاعلات مشحونة (الروابط التساهمية، والأيونية، والكهربائية الساكنة، والهيدروجينية)، والتفاعلات الكارهة للماء والتفاعلات ثنائية القطب. وتشمل الأخيرة المعروفة باسم قوى فان دير فال تفاعلات مثل ثنائي القطب الدائم-ثنائي القطب الدائم، ثنائي القطب الدائم-ثنائي القطب المستحث، ثنائي القطب المستحث-ثنائي القطب المستحث (قوى لندن التشتتية) [٥٨، ٥٩].

ومن المستغرب، أنه فقط في التسعينيات من القرن الماضي تم دراسة الببتيدات والبروتينات بشكلٍ منهجي من قبل الكيميائيين الفيزيائيين لإمكاناتها الهائلة كمجموعات بناء "غير حيوية" للكيمياء المتقدمة وتطوير المواد عدا الكائنات الحية (على سبيل المثال، [٦٠-٦٢]). وكان عامل الجذب هو القدرة على ضبط البروتينات من حيث التركيب والبناء التماثلي الفراغي، والقطبية، والوظيفية، والوظيفة عن طريق تغيير تسلسل الحمض الأميني المونومر. ومع ذلك، ونظراً لتعقيد تركيب البروتينات، وقوى التفاعلات الكثيرة، فإن التركيز على الببتيدات يبدو نهجاً أكثر عملية.

وتكون الببتيدات، خاصةً الصغيرة (٣-٢٥ مجموعات أحماض أمينية) هي موضع الاهتمام الكبير. فهي صغيرة بما يكفي لإنتاجها صناعياً ولإظهار الوظيفية الكافية والتنوع لدراسة التنظيم الذاتي الجزيئي من القاع-إلى القمة. ويتم تشغيل قدرة التجميع الذاتي عالية الاتجاهية للغاية عن طريق الظروف المحيطة، مثل التركيز، ودرجة

الحموضة، ودرجة الحرارة، والمجال الكهرومغناطيسي. وهي تسمح ببناء طبقات هرمية من التراكيب الجزيئية الفائقة والتحكم بها، وفي نهاية المطاف خلق مواد من مستوى النانو إلى المقياس الكبير (الشكل رقم ٦ ,٧).



الشكل رقم (٦ ,٧). ببتيدات عدة أحماض أمينية (٣-٢٥) سوف تتجمع ذاتياً لمختلف الأشكال اعتماداً على الظروف المحيطة (التركيز، والمذيبات، ودرجة الحموضة). قد يشكل المونومر قضيب الشكل صفائح البيتا على شكل شريط والتي بدورها تتجمع لتكون أشرطة، لييفات، وألياف [٦٣، ٦٤]. إذن من A. Aggeli, S. Scanlon.

(١ ,١ ,٥ ,٧) تطبيقات الببتيدات والبروتينات ذاتية التجميع

Self-Assembling Peptide and Protein Applications

توجد مجموعة واسعة من تطبيقات الببتيدات والبروتينات كمواد جديدة. وحتى الآن، تم دراسة الكثير من الببتيدات ذاتية التجميع إما مع التركيز على فهم آلية تشكيل التركيب وإما على استخدام هذه النظم والآليات لتطبيقات خاصة. ويرتبط عدد قليل من الجهود الصناعية الأكثر الصلة عدا التطبيقات الطبية والصيدلانية بـ[٦٥-٧١]:

- زخارف البناء.
- المنظفات والمواد المقللة للتوتر السطحي.
- المفاتيح الجزيئية.

obeikandl.com

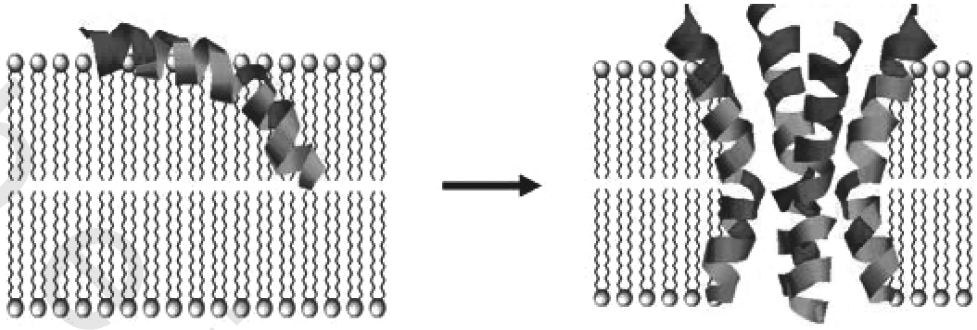
- الأحبار.
- ألياف النانو.
- أسلاك النانو.
- أنابيب وحويصلات النانو.
- طلائات النانو الوظيفية والطبقات السطحية.
- القوالب.
- سقالات التدعيم.
- الهلاميات المائية.

(٢, ١, ٥, ٧) الببتيدات المضادة للميكروبات Antimicrobial Peptides

يوجد تطبيق آخر مهم يستغل قدرة التنظيم الذاتي للببتيدات في عملها المضاد للميكروبات [٧٢-٧٩]. عادة ما تكون الببتيدات المضادة للميكروبات بين طول ١٢ و٥٠ مجموعات أحماض أمينية. وهي توجد في الطبيعة أو تخلق صناعياً. ويكون تسلسل الأحماض الأمينية وطولها خاص للببتيدات لتكون قادرة على الطوي لتركيبها النهائي كحلزون الألفا أو صفائح البيتا، ولتقسيمها في الأغشية الحيوية التي يكون معظمها من طبقات ثنائية من الدهون. وتحتوي الببتيدات المضادة للميكروبات على اثنين أو أكثر من المجموعات موجبة الشحنة المتوفرة من الأرجينين، والليسين، أو، في بيئات حمضية، الهيستيدين، ونسبة كبيرة (عادةً> ٥٠٪) من المجموعات الكارهة للماء. ويعتمد هذا الترتيب على تشكيل التركيب الثانوي مع جانب كاره للماء-غير قطبي (A) وجانب محب للماء-قطبي (P) ليتفاعل مع الغشاء الحيوي (الشكل رقم ٧,٧) [٨٠، ٨١]. ويمكن لهذه الحلزونات ثنائية الطبيعة تجاه الماء أن تتجمع معاً مشكلة تراكيب كروية مع سطح قطبي معرض في الوسط المائي. وعادةً، تتكون حلزونات الألفا من سبعة مجموعات من الأحماض الأمينية مما يسمح بالدورية لـ ٣,٥ أحماض أمينية في كل دور في تسلسل AAPAAAP أو PPAPPPA.

إن القدرة على الارتباط مع الأغشية لتنفيذ الخلية هي ميزة خاصة للببتيدات المضادة للميكروبات على الرغم من أنه يمكن أيضاً العمل على مجموعة من الأهداف السيتوبلازمية [٨٢]. ولكن تظهر البولي-جاما-ليسين، وهي ببتيدة موجبة من إل-ليسين تتواجد بشكلٍ طبيعي أيضاً نطاقاً واسعاً من النشاط المضاد للميكروبات في تركيزات منخفضة جداً وثابتة عند درجات الحرارة العالية [٨٣]. ويستخدم المنتج على نطاقٍ واسع في السوشي الياباني للحفاظ على النضارة.

ويفتح تطوير الطابع الثنائي تجاه الماء من خلال تشكيل التركيب الثانوي خيارات لمضادات الميكروبات القابلة للتحويل والمواد المقللة للتوتر السطحي القابلة للعكس [٨٤].



الشكل رقم (٧,٧). يتبع عمل الببتيدات المضادة للميكروبات تشكيل حلزونات الألفا ثنائية الطبيعة تجاه الماء التي تنفذ طبقة الدهون الثنائية للكائنات الدقيقة.

(٧,٥,١,٣) البروتينات المضادة للتجمد Antifreeze Proteins

البروتينات المضادة للتجمد (AFPs) أو البروتينات المكونة للجليد (ISPs) هي فئة من الببتيدات والبروتينات السكرية التي تنتجها بعض الفقاريات، والنباتات والفطريات والبكتيريا تسمح ببقائها على قيد الحياة في البيئات تحت درجة حرارة الصفر. تمنع الـ AFPs ارتباط أنوية جزيئات ماء الجليد وترتبط ببلورات الثلج الصغيرة لتثبيط نمو وإعادة تبلور الجليد، والذي من شأنه أن يدمر الخلايا والعضيات [٨٥-٨٨].

تجارياً، يبدو أن هناك استخدامات غير محددة للـ AFPs. ويمكن أن تكون الكثير من المجالات قادرة على الاستفادة من الحماية من تلف الأنسجة بالتجميد. وتحقق الشركات حالياً في الاستخدام في:

- زيادة تحمل نباتات المحاصيل للتجميد وإطالة موسم الحصاد في الأجواء الباردة.
- تحسين إنتاج مزارع الأسماك في الأجواء الباردة.
- إطالة فترة حياة الرف (التخزين) للأطعمة المجمدة.
- تحسين التجميد.
- زيادة حفظ الأنسجة لتحسين زراعة الأنسجة أو نقل الدم في الطب.
- علاج لانخفاض حرارة الجسم.

وحالياً تسوق شركتين الـ AFPs المستخرجة من الموارد الطبيعية: شركة A/F بروتين المحدودة، في الولايات المتحدة (www.afprotein.com/) وشركة الجليد للتقنية الحيوية في كندا (www.icebiotech.com/).

وكان إدخال البروتينات المضادة للتجمد في منتجات الآيس كريم والزبادي واحداً من أنجح المساعي التجارية الحديثة. يتم عزل البروتينات من الأسماك وتكرارها على نطاقٍ أوسع، في الخميرة. وحالياً، تقوم شركة يونيليفر بتضمين البروتينات المضادة للتجمد في بعض منتجاتها، بما في ذلك المصاصات وخط جديد من قضبان الآيس كريم المخضخضة المزدوجة. في الآيس كريم، تتيح البروتينات المضادة للتجمد إنتاج آيس كريم دسم جداً، وكثيف، ومنخفض الدهون مع عددٍ أقل من الإضافات. وهي تتحكم في نمو بللورات الجليد الناجمة عن الذوبان على طاولة المطبخ والتي تقلل جذرياً من جودة الملمس [٨٩، ٩٠].

(٤ , ١ , ٥ , ٧) المهجنات المخلقة حيوياً Biosynthetic Hybrids

على الرغم من الإمكانات الهائلة، فإن العقبة أمام الكثير من المواد القائمة على الببتيدات والبروتينات هي تعقيدها وارتفاع تكلفة تخليقها.

ويعتقد أنه من الممكن تجنب هذه العيوب إلى حدٍ ما من خلال نظم الهجين. والهدف من ذلك هو الجمع بين مزايا قدرة تكوين التركيب الثانوي المحدد للببتيدات والبروتينات مع خصائص المواد الممتازة ورخص وسهولة تخليق البوليمرات الصناعية. ويمكن تطبيق المبدأ نفسه على استخدام الجزيئات الحيوية الأخرى مثل الأحماض النووية، والدهون، والكربوهيدرات.

تتكون نظم الهجين البوليمري من عنصرين: أحدهما مسؤول عن خصائص المواد والآخر لتكوين التركيب الناتج عن تجميع الجزيء الحيوي العفوي أو المستحث. ويهيمن البوليمر الصناعي على خصائص المواد الناتجة. ومن المتوقع أن يسمح هذا باستهداف رشيد للتراكيب كما تم تعريفه بدوافع التجميع المعروفة في النظم الحيوية. وعلاوةً على ذلك، يمكن لهذه المواد أن يكون لها القدرة على التفاعل بنشاط مع النظم الحيوية الحية، ومعالجة التطلعات للالتصاق الحيوي، والتنافر الحيوي، والتوافق الحيوي، وقضايا التفاعل الحيوي الخاصة [٣٣، ٤٣، ٤٤، ٩١-٩٦].

(٢ , ٥ , ٧) البولي نيوكليوتيدات Polynucleotides

الدنا هو حمض نووي يحتوي على التعليمات الجينية لنمو وعمل الكائنات الحية. الدنا هو بوليمر طويل من وحدات بسيطة تسمى النيوكليوتيدات، والتي ترتبط معاً عن طريق عمود فقري مكون من مجموعات السكريات والفوسفات. وهذا العمود الفقري يحمل أربعة أنواع من الجزيئات تسمى القواعد، وتسلسل هذه القواعد الأربع هو الذي يرمز المعلومات. والنوكليوتيدة هي مركب كيميائي يتكون من ثلاثة أجزاء: قاعدة حلقية

غير متجانسة، وسكر، ومجموعة أو أكثر من الفوسفات. وفي معظم النيوكليوتيدات تشتق القاعدة من البيورين (أدينين، جوانين) أو البيريميدين (السيتوزين، اليوراسيل، الثايمين)، والسكر هو البنتوز (سكر خماسي الكربون) أو ديؤكسي الريبوز أو الريبوز. والنيوكليوتيدات هي مونومرات للأحماض النووية، مع ثلاثة أو أكثر من الروابط معاً لتكون الحمض النووي.

والرنا هو حمض نووي يتكون من مونومرات الينوكليوتيدات التي تقوم بدور الرسول بين الدنا والريبوزومات (العضية التي تخلق البروتينات). ويحتوي عديد النيوكليوتيدات للرنا على سكر الريبوز، وفي الغالب اليوراسيل، على عكس الدنا، الذي يحتوي على ديؤكسي الريبوز والثايمين في الغالب.

من الواضح أن البولي نيوكليوتيدات هذه تكمل استخدام الببتيدات والبروتينات. غير أن عدد وحدات البناء أقل ويقتصر هيكلها الثانوي عادةً على الحلزونات، مما يجعلها أكثر انتقائية ولكن أقل تنوعاً عند استغلال القدرة على التجميع الذاتي. ومع ذلك، لا تزال هناك إمكانية لمجموعة واسعة من التطبيقات [٩٧–١٠٨]، مثل:

- الأسلاك الموصلة النانوية.
- الأبنية والأنماط النانوية.
- الحوسبة.
- أجهزة التعرف الجزيئي.
- المحفزات.
- الأجهزة النانوية.
- الآلات النانوية.

حالياً، تقتصر أبحاث البولي نيوكليوتيدات في الغالب على المجال الأكاديمي، وتركز على اكتساب المعرفة واستكشاف البنى الهيكلية المحتملة المذكورة سابقاً.

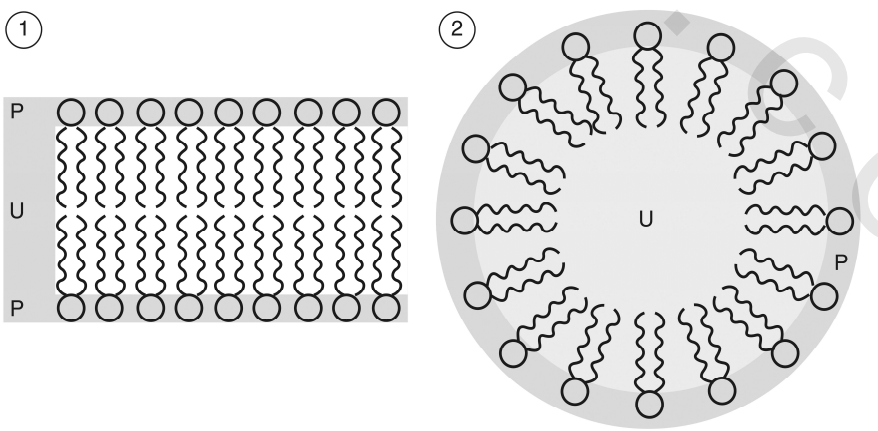
(٧, ٥, ٣) الدهون Lipids

الدهون هي مجموعة مركبات عضوية تحتوي على الهيدروكربون ثنائية الطبيعة تجاه الماء، ذات خصائص أنذياب معقدة، مما يؤدي إلى تعدد أشكال الدهون. تتكون مركبات الدهون في معظمها من ذيول من الهيدروكربون ومجموعات طرفية قطبية (على سبيل المثال، الوظيفية المعتمدة على الفوسفات، و/أو الوظيفية المعتمدة على الاينوزيتول (كربوهيدرات حلقي، عديد الأول). في الكائنات الحية، تستخدم الدهون لتخزين الطاقة، وبمثابة مكونات هيكلية لأغشية الخلايا، وتشكل مركبات إشارة مهمة. على الرغم من أن مصطلح الدهون كثيراً ما

يستخدم مرادفاً للدهن، فإن هذا الأخير هو في الواقع مجموعة فرعية من الدهون يسمى الدهون الثلاثية. كيميائياً، يمكن أن توصف الأحماض الدهنية كأحماض أحادية الكربوكسيل طويلة السلسلة ولها التركيب العام $CH_3(CH_2)_nCOOH$. يتراوح طول السلسلة عادةً من ١٢ إلى ٢٤، ودائماً ذات عدد زوجي من الكربون.

الجلسريدات هي دهون تحتوي على تركيب أساسي من الجلسرين (البروبان-١،٢،٣-تريول) مع واحد أو أكثر من مجموعات الأسيل الدهنية، والتي هي سلاسل مشتقة من أحماض دهنية مرتبطة بعمود الجلسرين الفقري بروابط أستيرية. والجلسريدات ثلاثية مجموعات الأسيل (الجلسريدات الثلاثية أو الدهون المحايدة) هي الصورة الرئيسة لتخزين الدهون في الحيوانات والنباتات.

الجلسريدات الفوسفاتية ودهون الجلسرين الفوسفاتية هي أنواع مهمة من الجزيئات القائمة على الجلسريد موجودة في الأغشية الحيوية، مثل غشاء البلازما الخلوي وأغشية العضيات داخل الخلايا. والغشاء الحيوي هو طبقة ثنائية دهنية. وتكوين طبقات الدهون الثنائية هي عملية مفضلة من ناحية الطاقة عندما تكون دهون الجلسرين الفوسفاتية في بيئة مائية. تتجه رؤوس الدهون القطبية تجاه البيئة القطبية المائية، في حين أن الذيول الكارهة للماء تقلل اتصالها مع الماء. تميل الذيول المحبة للدهون تميل إلى التجمع معاً، مكونةً طبقة دهنية ثنائية (١) أو مذيلة (٢). ويلاحظ أيضاً تجمعات أخرى وتشكل جزءاً من السلوك المتعدد الأشكال من مزدوج الاتجاهية للدهن. وتحث المذيلات والطبقات الثنائية جزيئات الماء في البيئة المائية إلى تشكيل قفص "مشبكي" منتظم حول الجزيئات المحبة للدهون المذابة (الشكل رقم ٨,٧). تتكون أقفاص المياه المشبكية المنتظمة حول الدهون المفردة الأمر الذي ينطوي على تجمع ذاتي عالي خصائص الديناميكية الحركية إلى طبقات ثنائية أو مذيلات (أي أنه يؤدي إلى تحرير الماء المرتبط، وهذا يعني كسب للطاقة). هذه هي القوة الرئيسة الدافعة للتجميع الذاتي.



الشكل رقم (٨,٧). التنظيم الذاتي للدهون الفوسفاتية. طبقة دهون ثنائية على اليسار (١) ومذيلة على اليمين (٢) P = رأس محب للماء متجه نحو المرحلة المائية و U = ذيل كاره للماء متجه للمرحلة غير المائية.

وتعتمد إمكانية تعدد أشكال التنظيم الذاتي على تركيز الدهون في المحلول. وتحت تركيز المذيلات الحرج (CMC) تكون الدهون طبقة واحدة على سطح السائل شحيحة الانتشار في المحلول. عند تركيز المذيلات الحرج الأول، تتجمع الدهون في مذيلات كروية، وعند نقاط معينة فوق هذا التركيز، تلاحظ مراحل أخرى.

يعتمد باحثو التقنية الحيوية النانوية على خصائص التجميع الذاتي للدهون لخلق تراكيب النانو، وأنماط وقوالب الغرويات [١٠٩-١١١]، ولاستكشاف التفاعلات مع الجزيئات الحيوية الأخرى [١١٢-١١٤]. وتستند براعة الدهون في الغالب على الكيمياء الفيزيائية لها وسلوك المرحلة، ولكن بصورةٍ أقل على التركيب عالي الانتظام والوظيفية كما هو الحال مع الببتيدات والبولي نيوكليوتيدات. وبشكلٍ مختلف، ينتج التجميع الذاتي للدهون بصفة رئيسة عن طريق فصل المراحل والتعبئة الجزيئية، بدلاً من أن تكون نتيجة لتفاعلات جزيئية خاصة. فهي تعتمد أساساً على خصائص الديناميكية الحركية، بينما في (بولي) ببتيدات و(بولي) نيوكليوتيدات يعتمد التجميع الذاتي أساساً على محتوي الطاقة الكلي.

في معظم الحالات تقيد سلامة تركيب الدهون بالظروف الفسيولوجية المحيطة المعينة. وهذا قد يكون مفيداً، لاسيما عند التفكير في مذيلات الدهون كوسيلة إيصال لمستحضرات التجميل [١١٥]، والمغذيات [١١٦]، والعقاقير [١١٧-١٢٠].

(٤ ,٥ ,٧) الكربوهيدرات Carbohydrates

الكربوهيدرات أو السكاريدات (من الكلمة اليونانية السكارون "السكر") هي ألدهيدات أو كيتونات عديدة الهيدروكسيل مستقيمة السلسلة تحتوي على ٣-٩ ذرات كربون. والكربوهيدرات هي الجزيئات الحيوية الأكثر وفرة، وتقوم بأدوارٍ عديدة في الطبيعة، مثل تخزين ونقل الطاقة (النشا، الجليكوجين) ومكونات هيكلية (السليولوز في النباتات، الكيتين في الحيوانات). وبالإضافة إلى ذلك، تؤدي الكربوهيدرات ومشتقاتها أدواراً رئيسة في عمل النظام المناعي، والإخصاب، والمرضية، وتخثر الدم، ونمو الخلايا.

تسمى الكربوهيدرات التي تحتوي على ٣ أو ٦ وحدات من السكريات الأحادية الأوليجوسكاريدات؛ وأي شيء أكبر من هذا هو بولي سكاريدات. يمكن أن تصل البولي سكريدات، مثل النشا والجليكوجين، أو السليولوز، إلى عدة آلاف من الوحدات في الطول. وتحتوي الكثير من الكربوهيدرات على واحد أو أكثر من وحدات السكريات الإحادية المحورة التي تم بها استبدال أو إزالة مجموعة أو أكثر. على سبيل المثال، ديؤكسي ريبوز، أحد مكونات الدنا، هو نسخة معدلة من الريبوز، أما الكيتين فيتكون من وحدات تكرارية من إن-أسيتيل جلوكوزامين، وهو صورة من الجلوكوز تحتوي عل النيتروجين.

تقدم الكربوهيدرات المزيد من التعقيد الكيميائي؛ لأنها تحتوي على عدة مراكز فراغية مما يؤدى إلى المتشابهات الفراغية.

والنشا، والسيليولوز، والأميلوبكتين، والأميلوز، والكيتين هي البوليمرات الحيوية الأكثر استخداماً تجارياً على نطاقٍ واسع. وقد كانت في الواقع البوليمرات الأولى التي تم دراستها واستخدامها لتحل محل المواد الطبيعية (مثل العاج) في التطبيقات الحديثة التي وضعت أسس صناعة البلاستيك الصناعي في أواخر القرن التاسع عشر.

في مجال التقنية الحيوية النانوية، تم دراسة الكربوهيدرات لمختلف الأغراض. والهلاميات المائية من الكربوهيدرات هي متوافقة حيوياً، ويمكن استخدامها لامتصاص الجزيئات الحيوية الأخرى [١٢١]. تسمح دراسة خصائص التجميع الذاتي للكربوهيدرات بتشكيلها لتركيبات نانو منتظمة أو بالاشتراك مع جزيئات أخرى في بناء تراكيب نانوية متميزة اعتماداً على تكوين جزيء الوحدة البنائية [١٢٢]. وتتعلق هذه النهج باستخدام البروتينات المضادة للتجمد على النحو المذكور سابقاً، والتي تسمح لجزء الكربوهيدرات بأن يكون وظيفياً مع جسيمات نانوية معدنية [١٢٣].

(٦ ,٧) العمليات والأجهزة Processes and Devices

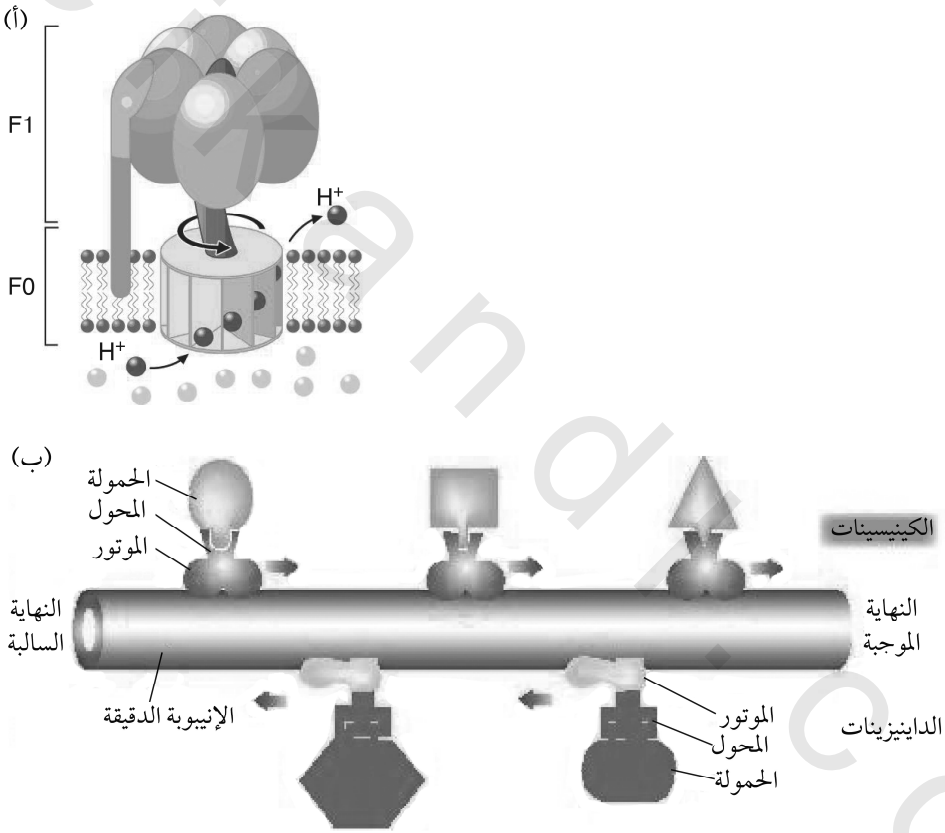
تضم التقنية الحيوية النانوية الكثير من أساليب العلوم والتقنيات، الأجهزة والأنظمة. والهدف هو فهم وبناء التراكيب بدءاً من الذرات والجزيئات من أجل تطوير منتجات ووظائف مفيدة. وتوضح الوحدات البنائية المختلفة الموجودة في الطبيعة والمذكورة سابقاً فائدة البراعة الفائقة لتحقيق ذلك تماماً. وقد وفرت الدراسات الشاملة للتراكيب النانو الخلوية مثل مراكز تفاعل البناء الضوئي، والريبوسومات، واستنساخ الدنا، والميتوكوندريا، والقنوات الغشائية الإلهام لاستغلال العمليات والأجهزة الحيوية المختلفة [١٠٠، ١٢٤].

(١ ,٦ ,٧) الآلات النانوية Nanomachines

يمكن تصور الآلات النانوية كتجمعات دقيقة مبنية من جزيئات مفردة ومفيدة كأدوات لخلق المواد المعقدة، لإصلاح العيوب الدقيقة على الأسطح أو في الخلايا الحية، أو لتخزين واسترجاع المعلومات. والآلات النانوية تكون مختلفة جداً عن عالم الآلات الكبيرة ولكن تؤدي وظائف مماثلة، مثل نقل الأشياء أو تغيير الأشكال.

والعنصر الأساسي في الآلات النانوية هو المحرك الجزيئي الذي يحول الطاقة الكيميائية إلى طاقة ميكانيكية. في الطبيعة يتحقق ذلك عادةً من خلال تحلل الـ ATP أو عن طريق تغيير أماكن الأيونات عبر أغشية الخلايا. بعض الأمثلة على المحركات الجزيئية الحيوية المهمة هي:

- البروتينات المحركة.
- الميوسين- المسؤول عن تقلص العضلات [١٢٥-١٢٧].
- الكينيسين- ينقل البضائع داخل الخلايا بعيداً عن النواة على طول الأنابيب الدقيقة [١٢٨، ١٢٩].
- الداينين- ينتج الضربات المحورية للأهداب والأسواط، وكذلك ينقل البضائع على طول الأنابيب الدقيقة نحو نواة الخلية [١٣٠، ١٣١].
- مخلق F0F1ATP- يولد ATP باستخدام تدرج البروتون الكهروكيميائي عبر الغشاء في الميتوكوندريا [١٣٢] (الشكل رقم ٩, ٧).



الشكل رقم (٩, ٧). توضيح مبسط للمحركات الجزيئية التي توفر حركة دورانية، مخلق F0F1ATP (أ)، وحركة خطية من الكينيسين والدينين (ب).

- الرنا بوليميريز- ينسخ الرنا من قالب الدنا [١٣٣].
- بلمرة الأكتين- تولد القوة، ويمكن استخدامه للدفع [١٣٤].

- التوبو أيزوميريز- يحد من الالتفاف الفائق للدنا في الخلية.
- سوط البكتيريا- مسئول عن سباحة إيشريشيا القولون والبكتيريا الأخرى وبمثابة مروحة متينة مدعومة بواسطة محرك دوار. وهذا المحرك مدفوع بتدفق الأيونات عبر الغشاء، وربما يستخدم آلية مماثلة لتلك الموجودة في محرك الـ F0 في مخلق ATP.
- محركات تعبئة وتغليف الحمض النووي الفيروسي- تحقن الحمض النووي الجيني الفيروسي في القفيصة كجزء من دورة تكاثره.
- المحركات الصناعية الجزيئية- التي أنتجها الكيميائيون لإنتاج الدوران، وربما لتوليد عزم الدوران.

وتوفر جميع هذه المحركات الجزيئية الحركة الدورانية، أو الدفع الأمامي الخطي. وسوف تكون أساسية في الأجهزة النانوية المستقبلية مثل العتلات، والصمامات، والمضخات، والكماشات، والقطع الوظيفية الأخرى في الآلات النانوية. وقد أفهم فهمها الأفضل من أي وقتٍ مضى العلماء لتطبيق مفاهيم مماثلة والبدء في تصميم الآلات الجزيئية.

والكينيسينات هي المسؤولة عن نقل الغازات أو الجلوكوز بوصفها بضائع للخلية عن طريق المشي أحادي الاتجاه في مسارات الإنيبيبات الدقيقة لتحلل جزيء واحد من الـ ATP في كل خطوة. وقد أهلم التشبيه مع "قطار البضائع" علماء ETH بزيورخ لبناء "سكك حديدية" كاملة للتطبيق، مثل طريقة التصوير السطحي المعتمدة على مسبارات مقياس النانو، والمدفوعة ببروتينات الحركة [١٣٥-١٣٧].

كان الباحثون في جامعة كورنيل (الولايات المتحدة الأمريكية) قادرين على توصيل بروتين حيوي محرك من نوع مخلق F0F1ATP إلى مروحة معدنية دقيقة. يتكون الجهاز من محرك ذي مساحة ١١ نانومتر مربع، يرتكز على رقاقة نيكل ٢٠٠ نانومتر، ومروحة نيكل طولها ٧٥٠ نانومتر. تم إنتاج القطع الدقيقة من المعدن باستخدام عمليات نظم إلكترونية كهربائية ميكانيكية دقيقة (MEMS). والطاقة المنطلقة من جزيئات الـ ATP الثلاثة اللازمة لتدوير المحرك هي في الواقع ٢٤٠ بيكو نيوتن لكل نانومتر، مما يتيح للمحرك معدل كفاءة بنسبة ٥٠٪ [١٣٨، ١٣٩].

وعدا المحركات الجزيئية الحيوية، يجري استخدام أساليب بديلة لتطوير المحركات الجزيئية المخلقة غير الحيوية، وغير الببتيدية، القادرة على الدوران مع مدخلات الطاقة. قام الكيميائيون بعدة محاولات. وأمكن لدوار ثلاثي الشفرات من التريبتيسين والمتصل بسقالة تدعيم جامدة من الهيلسين أن يدور بزاوية قدرها ١٢٠ درجة في تسلسل تفاعلي خماسي الخطوات [١٤٠].

وتم تطوير نظام دوران جزيئي يدور بزاوية قدرها ٣٦٠ درجة ويتم تنشيطه من خلال درجة الحرارة المتقدمة في جامعة جرونينجن (هولندا). ويتكون من بيس-هيلسين متصل برابطة ألكين ثنائية مظهراً تركيباً فراغياً محورياً وذا مركزين فراغيين [١٤١].

وتعدُّ سلاسل البوليمر الأحادية القابلة للتحويل هي أيضاً من المواد المرشحة المحتملة للمحركات من هذا القبيل. يمكن أكسدة البولي فيروسينيل داي ميثيل سيلان (PFS) عكسياً واختزاله باستخدام جهد خارجي. يؤدي هذا إلى تغييرات في الخصائص الميكانيكية، والتي يمكن استخدامها لدفع محرك دوري جزيئي [١٤٢].

وفي الآونة الأخيرة، صمم الباحثون في جامعة رايس في تكساس (الولايات المتحدة الأمريكية) جهازاً نانوي لحل مسألة كيفية انتقال الفوليرينات على السطوح المعدنية؛ خاصةً، إذا ما كانت تدور أو تنزلق. يتكون الجزيء الشبيه بالسيارة من هيكل على شكل حرف H مع مجموعات الفوليرين مرتبطة في الزوايا الأربع لتكون بمثابة عجلات. عندما ينتشر على سطح من الذهب، تلتصق الجزيئات على السطح عبر مجموعاتها من الفوليرين. عند تسخين السطح إلى ٢٠٠ درجة مئوية تتحرك الجزيئات إلى الأمام وإلى الوراء حيث إنها تدور على عجلات "الفوليرين". وسيارة النانو قادرة على الدوران؛ لأن عجلات الفوليرين تناسب محور الألكين من خلال رابطة كربون-كربون أحادية. ولا يكون الهيدروجين على ذرة الكربون المجاورة عقبة كبيرة للدوران الحر. وعندما تكون درجة الحرارة عالية بما فيه الكفاية، تدور روابط الكربون-الكربون الأربعة وتتحرك السيارة [١٤٣].

عدا المحركات، يجرى استكشاف الجيل القادم من أجهزة الكمبيوتر غير-السيليكا باستخدام الدنا بوصفها جزيئاً لتخزين المعلومات. في عام ١٩٩٤م، بين ليونارد أدلمان من جامعة جنوب كاليفورنيا (الولايات المتحدة الأمريكية) الدليل على صحة النظرية لاستخدام الدنا كشكل من أشكال الحساب [١٤٤]. بعد مرور عشر سنوات شيد باحثون في معهد وايزمان (إسرائيل) كمبيوتر الدنا [١٤٥]. وتعد أجهزة كمبيوتر الدنا هي أسرع وأصغر من أجهزة الكمبيوتر القائمة على السيليكون لبعض المشكلات المتخصصة،. ومع ذلك، ففي حالة المشكلات التي تنمو باطراد مع حجم المشكلة فإن كمية الدنا المطلوبة تكون كبيرة جداً وغير عملية.

ويعمل الدنا مزدوج السلسلة أو السلاسل التي تم تعديلها بكتل معدنية نانوية بمثابة نماذج لتخليق أسلاك معدنية نانوية. تستخدم هذه الأسلاك بوصفها وحدات بنائية لتجميع الأجهزة النانوية مثل الترانزستور أو ناقل نانوي [١٠١، ١٤٦].

(٢, ٦, ٧) الحساسات الحيوية والرقاقات الحيوية Biosensors and Biochips

تكون الجزيئات الحيوية وظيفية للغاية. ومع قدراتها للتجميع الذاتي، يمكن بناء أشكال وسطوح خاصة جداً اعتماداً على الظروف المحيطة. هذا يجعلها مثالية للكشف والإشارة عن عمليات معينة، والجسيمات، والمواد الكيميائية على المستوى الجزيئي. والمراجع في هذا المجال تنفجر بالأفكار وإثبات المفاهيم.

يتكون الحساس الحيوي عادةً من ثلاثة أجزاء:

- عنصر حيوي حساس (الأنسجة، والكائنات الدقيقة، والعضيات، ومستقبلات الخلية، والإنزيمات، والأجسام المضادة، والأحماض النووية، والببتيدات، والدهون، والكربوهيدرات).
- محول يربط ويترجم معلومات الحساس إلى جهاز الكشف.
- جهاز الكشف (يعرض ويسجل بطريقة فيزيائية كيميائية، وبصرية، وكهروضغطية كهروكيميائية، وقياس الحرارة، أو بتأثيرات مغناطيسية).

يمكن تقييد هذه الحساسات على أوساط تفاعل أو قد تكون حرة في السوائل أو المصل. وأيضاً تعرف الحساسات الحيوية كرقائق حيوية قياساً على صناعة أشباه الموصلات حيث أتاح التصغير تطويراً أكثر تقدماً من أي وقت مضى للحساسات الأصغر.

وهناك الكثير من التطبيقات المحتملة لمختلف أنواع الحساسات الحيوية للأبحاث الخاصة أو المتطلبات التجارية. ومن أمثلة ذلك:

- مراقبة نسبة الجلوكوز في مرضى السكري.
- الأهداف ذات الصلة بالصحة الطبية.
- التطبيقات البيئية (على سبيل المثال، الكشف عن المبيدات الحشرية وملوثات مياه النهر).
- الاستشعار عن بعد عن البكتيريا المحمولة جواً (على سبيل المثال، في مجال مكافحة - أنشطة الإرهاب الحيوي).
- الكشف عن مسببات الأمراض.
- تحديد مستويات المواد السامة قبل وبعد المعالجة الحيوية.
- كشف وتحديد الفوسفات العضوية.
- القياسات التحليلية الروتينية لحمض الفوليك، والبيوتين، وفيتامين B_{12}، وحمض البانتوثينيك كبديل للفحص الميكروبيولوجي.
- تحديد مخلفات العقاقير مثل المضادات الحيوية ومحفزات النمو، في الأغذية خاصة اللحوم والعسل.
- اكتشاف المخدرات وتقييم النشاط الحيوي للمركبات الجديدة.
- الفحص عالي الإنتاجية في مجال الجينوميات وبحوث البروتيوميات.

وعادة ما تستخدم البروتينات والبولي نيوكليوتيدات في الجزيئات الحساسة في حين توفر الدهون والكربوهيدرات عادةً سطوح أوساط التفاعل [١٤٧-١٥٥].

(٧, ٦, ٣) المفاعلات الحيوية Bioreactors

في سياق التقنية الحيوية النانوية يشير المفاعل الحيوي إلى أي جهاز أو نظام يدعم بيئة نشطة كيميائياً حيوياً على المستوى الجزيئي. وعلى العكس من المفاعلات الحيوية الكبيرة التي تتراوح في حجمها من بعض اللترات إلى أمتار مكعبة، تتكون المفاعلات الحيوية الحالية في حويصلات من حجم الميكرون أو النانو والتي قد تتم فيها أيضاً عملية كيميائية. وتبني المفاعلات لاستكشاف قدرة التجميع الذاتي للجزيئات الحيوية مثل الدهون والبروتينات، وبروتينات الطبقة السطحية، والكربوهيدرات. وفي عدد من الحالات الأخرى يتم تنشيط سطوح جزيئية حيوية مختلفة لتكون بمثابة مفاعلات عن طريق الإنزيمات المقيدة، والبولي نيوكليوتيدات، والكربوهيدرات [١٥٦-١٥٨]. ويتيح تصغير المفاعلات الفرص لأبحاث عالية الإنتاجية، كما في حالة الحساسات الحيوية.

(٧, ٦, ٤) المحفزات Catalysts

المحفزات هي الجزيئات التي تسهل وتسرع التفاعلات الكيميائية دون استهلاكها في العملية. وتستخدم المحفزات على نطاقٍ واسع في كل أنواع العمليات الكيميائية في مجموعة متنوعة من الصناعات. الإنزيمات هي النسخ الحيوية من المحفزات. وهي بروتينات تمكن عادةً التفاعلات شديدة الخصوصية وتعمل في تحت ظروف خفيفة، وصديقة للبيئة. وتستخدم الكثير من الإنزيمات الطبيعية وتدرس لإمكانية تطبيقها في الكثير من الصناعات. ويستفيد كثير من قطاعات السوق من البيئة القائمة على الماء والنشاط الخاص للإنزيمات.

وهناك الكثير من الإنزيمات ذات مستويات رائعة من التخصصية الفراغية، والانتقائية الفراغية، والانتقائية الكيميائية [١٥٩]. ومع ذلك، فالإنزيمات لها حدود في عدد التفاعلات التي يمكن أن تحفزها، وافتقارها إلى الثبات في المذيبات العضوية وفي درجات الحرارة العالية. بالإضافة إلى ذلك قد تكون العوامل المساعدة (الجزيئات المساعدة) لازمة لكي يحدث التحفيز الفعلي. وبناءً على ذلك، فإن الهندسة البروتينية تكون منطقة نشطة للبحث وتشمل المحاولات لخلق الإنزيمات الجديدة ذات الخصائص الجديدة، سواءً من خلال التصميم العقلاني أو التطوير في المختبر [١٦٠، ١٦١]. وتركز بعض البحوث، على سبيل المثال، على الليبيزات، وإيجاد الإنزيمات المثيرة للاهتمام في الطبيعة. فعلي سبيل المثال، تبحث شركة ديفيرسا المتحدة (www.diversa.com/) وماكسيجين المتحدة (www.maxygen.com/) في تطوير الإنزيمات للتطبيقات الطبية وغير الطبية.

الليبيز هو إنزيم قابل للذوبان في الماء يحفز تحليل روابط الأستر في أوساط الدهون غير القابلة للذوبان في الماء. والدور الفسيولوجي لليبيز هو تحليل الجليسريدات الثلاثية إلى جليسريدات ثنائية وأحادية، وأحماض دهنية، وجليسرول. من بين جميع الإنزيمات المعروفة، جذبت الليبيزات معظم الانتباه العلمي. وبالإضافة إلى وظيفتها

الطبيعية في تحليل روابط الإستر، يمكن أن تحفز الليبيزات تفاعلات الأسترة، الأسترة الداخلية، الأسترة الناقلة في البيئات غير المائية. هذا التنوع يجعل الليبيزات هي الإنزيمات المفضلة للتطبيقات المحتملة في صناعات الطعام، والمنظفات، والأدوية، والجلود، والنسيج، ومستحضرات التجميل، والصناعات الورقية. وتوجد معظم التطبيقات الصناعية ذات الدلالة لليبيزات في قطاعات الغذاء، والمنظفات، والأدوية [١٦٢].

وتلقى فئة معينة من الإنزيمات، اللاكيزات، الكثير من الاهتمام لقدرتها على أكسدة المركبات المرتبطة باللجنين الفينولية وغير الفينولية، وكذلك الملوثات البيئية. واللاكيزات هي مؤكسدات عديدة النحاس (مؤكسدات ٤،١ بنزين داي أول) (جليكوبروتينات ثنائية، ثلاثية أو رباعية الوحدة تحتوي على أربع ذرات النحاس لكل مونومر). توجد هذه الإنزيمات في النباتات العليا والفطريات والكائنات الدقيقة واسعة التخصصية، وتقوم بالأكسدة أحادية الإلكترون للفينولات الثنائية، الفينولات الكثيرة، والفينولات الأمينية، والأمينات الكثيرة، واللجنينات، والأمينات ثنائية الأرايل. ويمكن أيضاً استخدام اللاكيزات في خلايا الوقود المحفزة بالإنزيم. وهي تقوم باختزال الأكسجين إلى الماء، ويمكن أن تقترن بوسيط إلكتروني [١٦٣].

(٥ ,٦ ,٧) سقالات التدعيم Scaffolds

تفتح قدرة الكثير من الجزيئات الحيوية على التجميع الذاتي في هياكل عالية التنظيم الفرص لبناء أطر مصممة تدعم بصورةٍ مؤقتة صنع هياكل أكثر دواماً. لا سيما في المجال الطبي يمكن تصور عدة تطبيقات لسقالات التدعيم. أحدها هو هندسة الأنسجة لرعاية الجروح حيث توفر سقالات التدعيم المتوافقة حيوياً بدائل مؤقتة لمصفوفة خارج الخلية [١٦٤، ١٦٥]. وتختلف المفاهيم حول التئام الجروح وتتراوح بين استخدام الأنسجة المجددة، وهياكل النانو القابلة للتحلل الحيوي، والهلام المائي بهدف استخدام الكولاجين أو حث تشكيل الألياف في الجروح. ويمكن أيضاً استخدام سقالات التدعيم لتوفير المصفوفة لمختلف للخلايا، على سبيل المثال، الخلايا الجذعية التي تجدد العظام أو الأعصاب. استخدم الباحثون في جامعة نورث وسترن (الولايات المتحدة الأمريكية) محلول الببتيدات الذي يتجمع ذاتياً بعد حقنه في النخاع الشوكي أو العظام ويشكل بيئة للخلايا الجذعية لتجديد الأعصاب والعظام [١٦٦-١٦٨]. وبالمثل، فإن التبديل من المرحلة السائلة إلى الهلام ذاتي الدعم باستخدام الببتيدات ذاتية التجميع يوفر الدعامة لتشكيل التمعدن الحيوي [٥٦]، وتسليم الجزيئات النشطة في الأماكن التي من الصعب الوصول إليها [١٦٩].

وعدا التطبيقات الطبية التجميلية، فإنه يمكن تطبيق المبدأ نفسه لتسليم العقاقير، والأصباغ، والعطور، وتسليم الأنظمة الغروية.

(٧,٧) التوقعات Outlook

إن التقاء تقنية النانو والتقنية الحيوية إلى التقنية الحيوية النانوية قد حفز جهود البحوث المهمة. في السنوات القليلة الماضية كان ولازال عدد الأوراق البحثية ينمو باطراد. ومن الواضح أن الكثير من الدوافع تشجيع هذه العملية. ويؤكد التركيز على الاستدامة على الحاجة إلى مزيدٍ من المواد المفيدة بيئياً، والعمليات، والأجهزة للحفاظ على أو تحسين نوعية الحياة. فالبحث عن الإلهام في الطبيعة هو نتيجة منطقية. وقد منح الفهم الأفضل للعمليات الحيوية جنباً إلى جنبٍ مع أدوات جديدة لمعاملة الجزيئات الحيوية سبيلاً نحو السلع والخدمات المبتكرة. وقدمت البروتيوميات والجينوميات أدوات جديدة ورؤى في أعمال العمليات الطبيعية. ومع ذلك، لا تزال توجد الكثير من التحديات التي ينبغي التغلب عليها قبل أن يمكن تحقيق إمكانية التقنية الحيوية النانوية. ويتطلب العمل على المستوى الجزيئي أدوات مختلفة ويقدم للباحثين نوع جديد من الفيزياء. ويخضع التنظيم الذاتي للجزيئات والتجميع الذاتي للتراكيب عالية التنظيم ويرتبط ببيئة الواقع الجزيئي. ولذلك فإن فهم وتعلم تطبيق فيزياء الارتباط الجزيئي يكون مطلباً رئيساً. يوجد هناك تقريباً عدد غير محدود من احتمالات التنظيم الذاتي في ضوء براعة الوحدات البنائية وتنوع آليات التحريك والظروف المحيطة. وبالإضافة إلى ذلك، فإن إنتاج جزيئات حيوية مصممة ذات نوعية متسقة بكمياتٍ كبيرة ليس بعد حقيقة واقعة. على سبيل المثال، إن تعبير البروتينات مع تقنية الحمض النووي المؤتلف هو عملية مكلفة وخاصة جداً وذات تحديات هندسية مهمة بالنسبة للفصل والتنقية. ووفقاً لذلك فإن الكثير من الإمكانات النانوية سليمة من الناحية النظرية، ومبتكرة، ورائعة لكنها حتى الآن تقتصر أساساً على البحث الأكاديمي.

ومع ذلك، يجدر بنا أن نتذكر أن اعتبارات مماثلة كانت موجودة في بداية القرن التاسع عشر حول كونه من المستحيل تخليق المواد العضوية في المختبر. ونحن نعرف الآن بصورةٍ أفضل. وبالقياس على ذلك، تشمل التقنية الحيوية النانوية مجالات العلوم والتقنية في مهدها مع الكثير من المشكلات غير المحلولة وأدوات تقنية محدودة. علاوةً على ذلك، لا يوجد أي توجيه نحو السبيل الذي ينبغي اتباعه لتحقيق تطبيق صناعي ناجح باستثناء المعرفة بأن المستقبل موجود فعلاً في الطبيعة.

المراجع References

[١] Service, R.F. (2005) *Science*, **309,** 95.

[٢] Couper, A.S. (1858) *Annales de chemie et de physique, S é rie 3,* **53,** 488–489.

[٣] Kekul é, F.A. (1865) *Ann. Chem.*, **137,** 129–196.

[٤] Whitesides, G.M. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21** (10), 1161–1165.

[٥] Whitesides, G.M. and Boncheva, M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**(8), 4769–4774.

[٦] Wikipedia (2007) http://en.wikipedia.org/wiki/Nanotechnology (accessed 3/07).

[٧] Drexler, E.K. (1992) *Nanosystems:Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

[٨] United Nation Convention of Biological Diversity (2007) http://www.biodiv.org/biosafety/faqs.shtml?area=biotechnology & faq=1 (accessed 3/07).

[٩] Dawkins, R. (1976) *The Selfi sh Gene*, Oxford University Press, Oxford.

[١٠] Blackmore, S. (1999) *The Meme Machine*, Oxford University Press, Oxford.

[١١] Wackernagel, M., Schulz, B., Deumling, D., Callejas-Linares, A., Jenkins, M., Kapos, V., Monfreda, C., Loh, J., Myers, N., Norgaard, R., and Randers, J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99** (14), 9266–9271.

[١٢] Gewin, V. (2006) *Nature*, **444,** 514–515.

[١٣] Feynman, R.P. (1960) *Eng. Sci.*, **23,** 22–36.

[١٤] Mazzola, L. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21,** 1137–1143.

[١٥] Paull, R., Wolfe, J., Hebert, P., and Sinkula, M. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21,** 1134–1147.

[١٦] Salata, O.V. (2004) *J. Nanobiotechnol.*, **2**(3), 1–8.

[١٧] Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., and Alivisatos, A.P. (1998) *Science*, **281,** 2013–2016.

[١٨] Chan, W.C.W. and Nie, S.M. (1998) *Science*, **281,** 2016–2018.

[١٩] Wang, S., Mamedova, N., Kotov, N.A., Chen, W., and Studer, J. (2002) *Nano Lett.*, **2,** 817–822.

[٢٠] Mah, C., Zolotukhin, I., Fraites, T.J., Dobson, J., Batich, C., and Byrne, B.J. (2000) *Mol. Ther.*, **1,** S239.

[٢١] Panatarotto, D., Prtidos, C.D., Hoebeke, J., Brown, F., Kramer, E., Briand, J.P., Muller, S., Prato, M., and Bianco, A. (2003) *Chem. Biol.*, **10,** 961–966.

[٢٢] Edelstein, R.L., Tamanaha, C.R., Sheehan, P.E., Miller, M.M., Baselt, D.R., Whitman, L.J., and Colton, R.J. (2000) *Biosens. Bioelectron.*, **14,** 805–813.

[٢٣] Nam, J.M., Thaxton, C.C., and Mirkin, C.A. (2003) *Science*, **301,** 1884–1886.

[٢٤] Mahtab, R., Rogers, J.P., and Murphy, C.J. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117,** 9099–9100.

[٢٥] Ma, J., Wong, H., Kong, L.B., and Peng, K.W. (2003) *Nanotechnology*, **14,** 619–623.

[٢٦] de la Isla, A., Brostow, W., Bujard, B., Estevez, M., Rodriguez, J.R., Vargas, S., and Castano, V.M. (2003) *Mater. Res. Innov.*, **7,** 110–114.

[٢٧] Yoshida, J., and Kobayashi, T. (1999) *J. Magn. Mater.*, **194,** 176–184.

[٢٨] Molday, R.S. and MacKenzie, D. (1982) *J. Immunol. Methods*, **52,** 353–367.

[٢٩] Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenburg , J., Rabito, C.A., Bengele, H.H., and Josephson, L. (1990) *Radiology*, **175,** 489–493.

[٣٠] Parak, W.J., Boudreau, R., Gros, M.L., Gerion, D., Zanchet, D., Micheel, C.M., Williams, S.C., Alivisatos, A.P., and Larabell, C.A. (2002) *Adv. Mater.*, **14,** 882–885.

[٣١] Benyus, J.M. (1997) *Biomimicry: Innovation Inspired by Nature*, Harper Collins Publishes, New York.

[٣٢] Biomimicry Institute (2007) http://www.biomimicry.net/indexbiomimicryexp.htm (accessed 3/07).

[٣٣] Kaplan, D. (1994) *Silk Polymers:Materials Science and Biotechnology*, American Chemical Society, Washington, DC.

[٣٤] Vollrath, F. (1992) *Sci. Am.*, **266** (3), 70–76.

[٣٥] Rising, A., Nimmervoil, H., Grip, S., Fernandez-Arias, A., Storckenfeldt, E., Knight, D.P., Vollrath, F., and Engstroem, W. (2005) *Zoolog. Sci.*, **22** (3), 273–281.

[٣٦] Vollrath, F. (1999) *Int. J. Biol. Macromol.*, **24,** 81.

[٣٧] Knight, D. and Vollrath, F. (2002) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **357** (1418), 219–227.

[٣٨] Shao, Z., Vollrath, F., Yang, Y., and Thogersen, H.C. (2003) *Macromolecules*, **36** (4), 1157–1161.

[٣٩] Vollrath, F. and Porter, D. (2006) *Soft Matter*, **2** (5), 377–385.

[٤٠] Chen, X., Shao, Z., and Vollrath, F. (2006) *Soft Matter*, **2** (6), 448–451.

[٤١] Hakimi, O., Knight, D., Vollrath, F., and Vadgama, P. (2007) *Compos. Part B: Eng.*, **38B** (3), 324–337.

[٤٢] Riekel, C., Madsen, B., Knight, D., and Vollrath, F. (2000) *Biomacromolecules*, **1**(4), 622–626.

[٤٣] Smeenk, J.M., Otten, M.B.J., Thies, J., Tirrell, D.A., Stunnenberg, H.G., and van Hest, J.C.M. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44** (13), 1968–1971.

[٤٤] Smeenk, J.M., Ayres, L., Stunnenberg, H.G., and van Hest, J.C.M. (2005) *Macromol. Symp.*, **225,** 1–8.

[٤٥] Geim, A.K., Dubonos, S.V., Grigorieva, I.V., Novoselov, K.S., Zhukov, A.A., and Shapoval, S.Y. (2003) *Nat. Mater.*, **2,** 461–463.

[٤٦] Sun, W., Neuzil, P., Kustandi, T.S., Oh, S., and Samper, V.D. (2005) *Biophys. J.*, **89** (2), L14–L17.

[٤٧] University of Manchester, UK (2007) http://www.cs.manchester.ac.uk/nanotechnology/news.php (accessed 3/07).

[٤٨] University of California, Berkeley, USA (2007) http://www.berkeley.edu/news/ media/releases/ 2006/08/22_microfi ber.shtml (accessed 3/07).

[٤٩] Rizzo, N.W., Gardner, K.H., Walls, D.J., Keiper-Hrynko, N.M., Ganzke, T.S., and Hallahan, D.L. (2006) *J. R. Soc. Interface*, **3** (8), 441–451.

[٥٠] Tang, Z., Kotov, N.A., Magonov, S., and Ozturk, B. (2003) *Nat. Mater.*, **2** (6), 413–418.

[٥١] Lee, J.-W., Gulari, E., and Kotov, N.A. (2005) *Langmuir*, **21** (25), 11915–11921.

[٥٢] Fan, H. and Brinker, J. (2004) *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **148,** 213–240.

[٥٣] Yu, K., Smarsly, B., and Brinker, J. (2002) *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, **728,** 23–29.

[٥٤] Gower, L.A. and Tirrell, D.A. (1998) *J. Cryst. Growth*, **191,** 153–160.

[٥٥] Gower, L.A. and Odom, D.J. (2000) *J. Cryst. Growth*, **210,** 719–734.

[٥٦] Mann, S. (2001) *Biomineralization: Principles and Concepts in BioinorganicMaterials Chemistry*, Oxford Chemistry Masters, Oxford.

[٥٧] Boskey, A.L. (2003) *Connect. Tissue Res.*, **44** (Suppl. 1), 5–9.

[٥٨] Thompson, D.W. (1992) *On Growth and Form*, Dover Publications Inc., New York.

[٥٩] Hyde, S., Andersson, S., Larsson, K., Blum, Z., Landh, T., Lidin, S., and Ninham, B.W. (1997) *The Language of Shape*, Elsevier, Amsterdam.

[٦٠] Tirrel, D.A. (2007) California Institute of Technology, USA: http://www.che. caltech.edu/faculty/ tirrell_d/index.html (accessed 3/07).

[٦١] Zhang, S. (2007) Massachusetts Institute of Technology, USA: http://web.mit.edu/lms/www/ (accessed 3/07).

[٦٢] Boden, N. and Aggeli, A. (2007) University of Leeds, UK: http://www.soms.leeds.ac.uk/ (accessed 3/07).

[٦٣] Aggeli, A., Bell, M., Boden, N., Keen, J.N., Knowles, P.F., McLeish, T.C.B., Pitkeathly, M., and Radford, S.E. (1997) *Nature*, **386,** 259–262.

[٦٤] Aggeli, A., Nyrkova, I.A., Bell, M., Harding, R., Carrick, L., McLeish, T.C.B., Semenov, A.N., and Boden, N. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**(21), 11857–11862.

[٦٥] Zhao, X. and Zhang, S. (2004) *Trends Biotechnol.*, **22** (9), 470–476.

[٦٦] Zhao, X. and Zhang, S. (2006) *Chem. Soc. Rev.*, **35** (11), 1105–1110.

[٦٧] Zhao, X. and Zhang, S. (2006) *Adv. Polym. Sci.*, **203,** 145–170.

[٦٨] Zhang, S., Yokoi, H., and Zhao, X. (2005) in *Biomimetics*, Biologically inspired technologies (Y. Bar-Cohen, ed.) CRC Press, 229–242.

[٦٩] Woolfson, D.N. and Ryadnov, M.G. (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10** (6), 559–567.

[٧٠] Sara, M., Egelseer, E.-M., Huber, C., Ilk, N., Pleschberger, M., Pum, D., and Sleytr, U.B. (2006) *Microb Bionanotechnol.*, Microbial Nanotechnology, (B. Rehm, ed.) Horozon BioScience, 307–338.

[٧١] Sara, M., Pum, D., Schuster, B., and Sleytr, U.B. (2005) *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **5** (12), 1939–1953.

[٧٢] Blondelle, S.E. and Houghton, R.A. (1992) *Annu. Rep. Med. Chem.*, **27,** 159–167.

[٧٣] Tieleman, D.P. and Sansom, M.S.P. (2001) *Int. J. Quantum. Chem.*, **83,** 166–179.

[٧٤] Lu, H.S.M. (2006) US Patent Application 2006/166883.

[٧٥] Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. (2000) *Biopolymers*, **55,** 4–30.

[٧٦] Rydlo, T., Miltz, J., and Mor, A. (2006) *J. Food Sci.*, **71** (9), 125–135.

[٧٧] Zelezetsky, I. and Tossi, A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1758** (9), 1436–1449.

[٧٨] Cudic, M. and Otvos, L. (2002) *Curr. Drug Targets*, **3,** 101.

[٧٩] Hogenhaug, H.-H.K., Mygind, P.H., Segura, D.R., Taboureau, O., and Sonksen, C.P. (2006) US Patent Application 2006/0280780 A1.

[٨٠] Papagianni, M. (2003) *Biotechnol. Adv.*, **21,** 465.

[٨١] Sitaram, N. and Nagaraj, R. (2002) *Curr. Pharmacol. Des.*, **8,** 727.

[٨٢] Hancock, R.E.W. and Rozek, A. (2002) *FEMS Microbiol. Lett.*, **206,** 143.

[٨٣] Yoshida, T. and Nagasawa, T. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62** (1), 21–23.

[٨٤] Dexter, A.F., Malcolm, A.S., and Middelberg, A.P.J. (2006) *Nat. Mater.*, **5** (6), 502–506.

[٨٥] Raymond, J.A. and DeVries, A.L. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74** (6), 2589–2593.

[٨٦] Raymond, J., Wilson, P., and DeVries, A.L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86,** 881–885.

[٨٧] Sicheri, F. and Yang, D.S. (1995) *Nature*, **375,** 427–431.

[٨٨] Scotter, A.J., Marshall, C.B., Graham, L.A., Gilbert, J.A., Garnham, C.P., and Davies, P.L. (2006) *Cryobiology*, **53** (2), 229–239.

[٨٩] Regand, A. and Goff, H.D. (2006) *J. Dairy Sci.*, **89** (1), 49–57.

[٩٠] Kontogiorgos, V., Regand, A., Yada, R.Y., and Goff, H.D. (2007) *J. Food Biochem.*, **31** (2), 139–160.

[٩١] Hinman, M.B., Jones, J.A., and Lewis, R.V. (2000) *Trends Biotechnol.*, **18,** 374–379.

[٩٢] Creel, H.S., Fournier, M.J., Mason, T.L., and Tirrell, D.A. (1991) *Macromolecules*, **24,** 1213–1214.

[٩٣] McGrath, K.P., Tirrell, D.A., Kawai, M., Mason, T.L., and Fournier, M.J. (1990) *Biotechnol. Prog.*, **6,** 188–192.

[٩٤] Krejchi, M.T., Atkins, E.D.T., Waddon, A.J., Fournier, M.J., Mason, T.L., and Tirrell, D.A. (1994) *Science*, **265,** 1427–1432.

[٩٥] Parkhe, A.D., Cooper, S.J., Atkins, E.D.T., Fournier, M.J., Mason, T.L., and Tirrell, D.A. (1998) *Int. J. Biol. Macromol.*, **23,** 251–258.

[٩٦] van Hest, J.C.M. and Tirrell, D.A. (2001) *Chem. Commun. (Camb.)*, **19,** 1897–1904.

[٩٧] Niemeyer, C.M. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4** (6), 609–618.

[٩٨] Ito, Y. and Fukusaki, E. (2004) *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **28** (4–6), 155–166.

[٩٩] Metzler, R. and Ambjornsson, T. (2005) *J. Comput. Theor. Nanosci.*, **2** (3), 389–395.

[١٠٠] Wagner, P. (2005) in *Nanoscale technology in biological systems*, (R.S. Greco, F.B. Prinz, R.L. Smith, eds.) CRC Press, 39–54.

[١٠١] Baron, R., Willner, B., and Willner, I. (2007) *Chem. Commun. (Camb.)*, **4,** 323–332.

[١٠٢] Niemeyer, C.M. (2004) in *Nanotechnology: concepts, methods and applications* (C.M. Niemeyer, C.A. Mirkin, eds.), 227–243.

[١٠٣] Seeman, N.C. (2004) *Sci. Am.*, **290** (6), 64–75.

[١٠٤] Sa-Ardyen, P., Jonoska, N., and Seeman, N.C. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126,** 6648–6657.

[١٠٥] Carbone, A., Mao, C., Constantinou, P., Ding, B., Kopatsch, J., Sherman, W.B., and Seeman, N.C. (2004) *Nat. Comput.*, **3,** 235–252.

[١٠٦] Seeman, N.C. (2005) *Trends Biochem. Sci.*, **30,** 119–235.

[١٠٧] Ding, B. and Seeman, N.C. (2006) *Science*, **314,** 1583–1585.

[١٠٨] Zhong, H. and Seeman, N.C. (2006) *Nano Lett.*, **6,** 2899–2903.

[١٠٩] Nicolini, C. (1996) *Book of Abstracts, 212th ACS National Meeting, Orlando, FL, August*, 25–29.

[١١٠] Schuster, B. and Sleytr, U.B. (2006) *Curr. Nanosci.*, **2**(2), 143–152.

[١١١] Sleytr, U.B., Huber, C., Ilk, N., Pum, D., Schuster, B., and Egelseer, E.-M. (2007) *FEMS Microbiol. Lett.*, **267** (2), 131–144.

[١١٢] El Kirat, K., Lins, L., Brasseur, R., and Dufrene, Y.F. (2005) *J. Biomed. Nanotechnol.*, **1**(1), 39–46.

[١١٣] Kitamoto, D., Imura, T., Yanagishita, H., Takeyama, Y., Idemoto, Y., and Nobuyuki, K. (2003) *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, **28** (3), 545–548.

[١١٤] Scheidt, H.A., Flasche, W., Cismas, C., Rost, M., Herrmann, A., Liebscher, J., and Huster, D. (2004) *J. Phys. Chem.*, **108** (41), 16279–16287.

[١١٥] Kanga, V.D. and Wille, J.J. (eds) (2006) *Skin Delivery Systems*, Blackwell Publishing Professional, Ames, USA., pp. 173–185.

[١١٦] Souto, E.B. and Mueller, R.H. (2006) *J. Food Technol.*, **4**(1), 90–95.

[١١٧] Li, W. and Szoka, F.C., Jr. (2007) *Pharm. Res.*, **24**(3), 438–449.

[١١٨] Zhou, Y. (2006) *Curr. Nanosci.*, **2**(2), 123–134.

[١١٩] Shimizu, T. (2006) *J. Polym. Sci. A*, **44**(17), 5137–5152.

[١٢٠] Uner, M. (2006) *Pharmazie*, **61**(5), 375–386.

[١٢١] Yamaguchi, S., Hamachi, I., and Yuasa, H. (eds) (2006) *Nanotechnology in Carbohydrate Chemistry*, Transworld Research Network, Trivandrum, India, pp. 43–65.

[١٢٢] Lim, Y.-B. and Lee, M. (2007) *Org. Biomol. Chem.*, **5** (3), 401–405.

[١٢٣] de la Fuente, J.M. and Penades, S. (2006) *Biochim. Biophys. Acta, General Subjects*, **1760** (4), 636–651.

[١٢٤] Choi, J.-W., Oh, B.-K., Kim, Y.-K., and Min, J. (2007) *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17** (1), 5–14.

[١٢٥] Mermall, V., Post, P.L., and Mooseker, M.S. (1998) *Science*, **279,** 527–533.

[١٢٦] Mehta, A.D., Rief, M., Spudich, J.A., Smith, D.A., and Simmons, R.M. (1999) *Science*, **283,** 1689–1695.

[١٢٧] Howard, J., Hudspeth, A.J., and Vale, R.D. (1989) *Nature*, **342,** 154–158.

[١٢٨] Mather, W.H. and Fox, R.F. (2006) *Biophys. J.*, **91,** 2416–2426.

[١٢٩] Asbury, C.L. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17,** 89–97.

[١٣٠] Karp, G. (2005) in *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*, 4th edn, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, pp. 346–358.

[١٣١] Schroer, T.A. (2004) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20,** 759–779.

[١٣٢] Tsunoda, S.P., Aggeler, R., Yoshida, M., and Capaldi, R.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98,** 898–902.

[١٣٣] Dworkin, J. and Losick, R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99,** 14089–14094.

[١٣٤] Straub, F.B. and Feuer, G. (1950) *Biochim. Biophys. Acta.*, **4,** 455–470.

[١٣٥] Hess, H., Clemmens, J., Brunner, C., Doot, R., Luna, S., Ernst, K.-H., and Vogel, V. (2005) *Nano Lett.*, **5** (4), 629–633.

[١٣٦] Hess, H., Bachand, G.D., and Vogel, V. (2004) *Chemistry*, **10,** 2110–2116.

[١٣٧] Clemmens, J., Hess, H., Doot, R., Matzke, C.M., Bachand, G.D., and Vogel, V. (2004) *Lab Chip*, **4,** 83–86.

[١٣٨] Bachand, G.D. and Montemagno, C.D. (2000) *Biomed. Microdevices*, **2** (3), 179–184.

[١٣٩] Bachand, G.D., Soong, R.K., Neves, H.P., Olkhovets, A., Graighead, H.G., and Montemagno, C.D. (2001) *Nano Lett.*, **1** (1), 42–44.

[١٤٠] Morin, J.-F., Shirai, Y., and Tour, J.M. (2006) *Org. Lett.*, **8** (8), 1713–1716.

[١٤١] Ross Kelly, T., De Silva, H., and Silva, R.A. (1999) *Nature*, **401,** 150–152.

[١٤٢] Vicario, J., Walko, M., Meetsma, A., and Feringa, B.L. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (15), 5127–5135.

[١٤٣] Butt, H.-J. (2006) *Macromol. Chem. Phys.*, **207** (6), 573–575.

[١٤٤] Adleman, L.M. (1994) *Science*, **266** (11), 1021–1024.

[١٤٥] Martyn, A. (2005) *Theoretical and Experimental DNA Computation*, Springer Verlag, Munchen.

[١٤٦] Lieber, C.M. and Wang, Z.L. (2007) *MRS Bull.*, **32** (2), 99–108.

[١٤٧] Kauffmann, J.-M. (2003) *J. Pharm. Sci.*, **28** (2), 107–112.

[١٤٨] Anrather, D., Smetazko, M., Saba, M., Alguel, Y., and Schalkhammer, T. (2004) *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **4** (1/2), 1–22.

[١٤٩] Girard-Egrot, A.P., Godoy, S., and Blum, L.J. (2005) *Adv. Colloid. Interface Sci.*, **116** (1–3), 205–225.

[١٥٠] Schuster, B. (2005) *NanoBiotechnology*, **1** (2), 153–164.

[١٥١] Fehr, M., Okumoto, S., Deuschle, K., Lager, I., Looger, L.L., Persson, J., Kozhukh, L., Lalonde, S., and Frommer, W.B. (2005) *Biochem. Soc. Trans.*, **33** (1), 287–290.

obeikandl.com

[١٥٢] Jelinek, R. and Kolusheva, S. (2004) *Chem. Rev.*, **104** (12), 5987–6015.
[١٥٣] Fukuda, T., Shiraga, S., Michiko, K., Suye, S.-I., and Ueda, M. (2006) *Biotechnol. Prog.*, **22** (4), 944–948.
[١٥٤] Scheller, F.W., Bier, F.F., and Pfeiffer, D. (1995) *Technisches Messen*, **62** (5), 213–219.
[١٥٥] Briones, C. and Martin-Gago, J.A. (2006) *Curr. Nanosci.*, **2** (3), 257–273.
[١٥٦] Karlsson, M., Davidson, M., Karlsson, R., Karlsson, A., Bergenholtz, J., Konkoli, Z., Jesorka, A., Lobovkina, T., Hurtig, J., Voinova, M., and Orwar, O. (2004) *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **55,** 613–649.
[١٥٧] Ariga, K., Sasaki, Y., and Kikuchi, J.-I. (2003) in *Surfactant Science Series 111, (Biomolecular Films)*, (J.F. Rusling, ed.) Marcel Dekker, 381–426.
[١٥٨] Rusling, J.F. and Zhang, Z. (2003) *Surfactant Science Series 111, (Biomolecular Films)*, (J.F. Rusling, ed.) Marcel Dekker, 1–64.
[١٥٩] Jaeger, K.E. and Eggert, T. (2004) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15** (4), 305–313.
[١٦٠] Renugopalakrishnan, V., Garduno-Juarez, R., Narasimhan, G., Verma, C.S., Wei, X., and Li, P. (2005) *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **5** (11), 1759–1767.
[١٦١] Hult, K. and Berglund, P. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14** (4), 395–400.
[١٦٢] Houde, A., Kademi, A., and Leblanc, D. (2004) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **118**(1–3), 155–170.
[١٦٣] Rodriguez-Couto, S. and Toca-Herrera, J.L. (2006) *Biotechnol. Adv.*, **24** (5), 500–513.
[١٦٤] Dvir, T., Tsur-Gang, O., and Cohen, S. (2005) *Isr. J. Chem.*, **45** (4), 487–494.
[١٦٥] Wen, X., Shi, D., and Zhang, N. (2005) *Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology*, vol. 2, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch CA, pp. 393–414.
[١٦٦] Stupp, S.I. (2005) *MRS Bull.*, **30,** 546–553.
[١٦٧] Silva, G.A., Czeisler, C., Niece, K.L., Beniash, E., Harrington, D.A., Kessler, J.A., and Stupp, S.I. (2004) *Science*, **303,** 1352–1355.
[١٦٨] Bell, C.J., Carrick, L.M., Katta, J., Jin, Z., Ingham, E., Aggeli, A., Boden, N., Waigh, T.A., and Fisher, J. (2006) *J. Biomed. Mater. Res. A*, **78A** (2), 236–246.
[١٦٩] Stayton, P.S., El-Sayed, M.E.H., Murthy, N., Bulmus, V., Lackey, C., Cheung, C., and Hoffman, A. (2005) *Orthod. Craniofac. Res.*, **8** (3), 219–225.

Obeikandl.com

الفصل الثامن

عمليات التجهيز النهائي في التقنية الحيوية الصناعية
DOWNSTREAM PROCESSING IN INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY

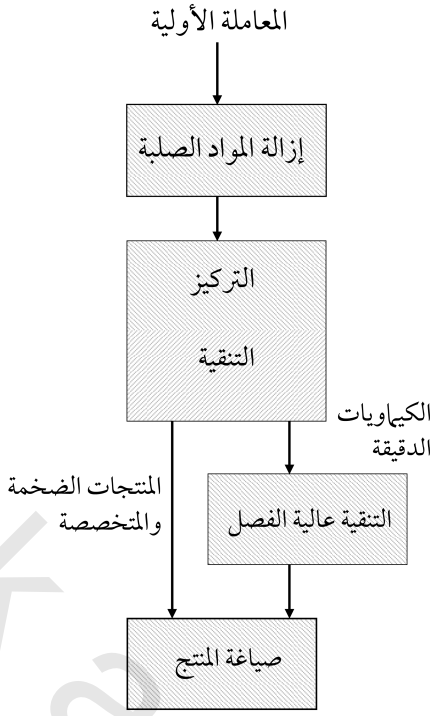
راجني هاتي-كاول
Rajni Hatti - Kaul

(٨,١) المقدمة Introduction

تعني عملية التجهيز النهائي (DSP) استرجاع منتج للتقنية الحيوية من مفاعل حيوي وتنقيته إلى صورةٍ مناسبة للاستخدام المقصود منه [١]. وتتنوع منتجات التقنية الحيوية الصناعية وعادةً ما يتم تقسيمها إلى الكيماويات، والمواد، والوقود. وحيث إن الإنتاج يقوم أساساً على تقنية التخمير والتحفيز الحيوي، فإن نقطة بداية عملية التجهيز النهائي تشكل في كثيرٍ من الأحيان إما محلول التخمير الخام الذي يحتوي على الخلايا المنتجة، والمواد المغذية، ونواتج الأيض، والوسائط غير المستهلكة، والمنتجات الجانبية، وما إلى ذلك في كمياتٍ كبيرة من الماء وإما خليط التفاعل الذي يحتوي على الإنزيم/ الخلايا الكاملة (الحرة أو المقيدة)، والمواد المتفاعلة، والمذيبات، والمياه، والمنتجات الجانبية. وبذلك تشمل التحديات الرئيسة في عملية التجهيز النهائي فصل المنتج الذي غالباً ما يتكون بتركيزات منخفضة نسبياً، من عددٍ وافر من المكونات الأخرى، وخاصةً تلك ذات الخصائص المماثلة للمنتج نفسه.

ويبدأ التسلسل التقليدي للفصل باستخدام التقنيات التي تفصل المكونات ذات الفرق الأكبر في الخصائص الفيزيائية الكيميائية وينتهي بفصل الجزيئات ذات خصائص أكثر أو أقل مماثلة (الشكل رقم ٨,١). وهذا يجعل فصل المنتج القابل للذوبان من الكتلة الخلوية أو المحفز الحيوي عملية استرجاع أولية. وفي حال كان المنتج داخل الخلايا، على سبيل المثال، البروتينات والبوليمرات الحيوية الأخرى، فإنه يجب تمزيق الخلايا لتحرير المنتج يليها خطوة فصل صلبة-سائلة أخرى. ثم تتم معالجة السائل الخالي من الجسيمات لتركيز وتنقية المنتج باستخدام عدد من وحدات التشغيل، والتي لا يتم تحديد اختيارها عن طريق خصائص المنتج فحسب ولكن أيضاً عن طريق تعقيد الفصل، وحجم العملية، والاقتصاديات، ونقاء المنتج المطلوب.

obeikandi.com



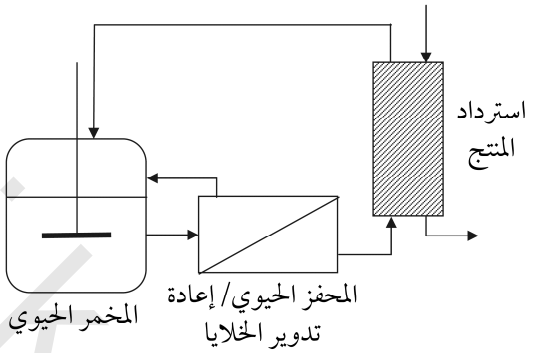
الشكل رقم (١ ,٨). مخطط مبسط لعملية التجهيز النهائي لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية.

وقد تم أدراك أهمية عملية التجهيز النهائي عن طريق تأثيرها على إجمالي تكاليف الإنتاج. ويقترح أن عملية التجهيز النهائي تشكل عادةً ٥٠-٧٠٪ من إجمالي تكاليف الإنتاج لمنتجات التخمر؛ ويمكن أن تتراوح التكاليف للمنتجات الضخمة بين ١٠-٥٠٪، وتصل إلى ٩٠٪ للمنتجات الصيدلانية عالية النقاء. وحيث إن إنتاج التكنولوجيا الحيوية يتحرك نحو إنتاج المواد الكيميائية بحجمٍ كبير وسعرٍ منخفض، فإنه يصبح من الضروري أن نحد من التكاليف عن طريق تعظيم كفاءة الفصل مع الحد الأدنى من مدخلات الطاقة والتوليد المنخفض للنفايات.

وعليه فإنه من المهم النظر في إستراتيجية عملية التجهيز النهائي عند تصميم العمليات الحيوية. ويكون الخيار الأمثل لتقنيات الفصل حاسماً. وفوق ذلك فإن إمكانية استخدام فصل المنتج كوسيلة لحصاد المنتج مباشرة من المفاعل الحيوي (الشكل رقم ٢ ,٨) تعد جانباً آخر مثيراً للاهتمام. ويجذب مفهوم إزالة المنتج في الموقع (ISPR) الاهتمام المتزايد كحلٍ تقني لتحسين إنتاجية العمليات الحيوية والتي تتميز في كثيرٍ من الأحيان بالعائدات المنخفضة. ويمكن توقع زيادة العائد؛ بسبب التغلب على الآثار المثبطة أو السامة للمنتجات، أو التقليل من خسارة المنتج بواسطة التحلل، أو تحويل توازنات التفاعلات غير المناسبة [٢-٦]. وعلاوةً على ذلك، يمكن تخفيض عدد خطوات التجهيز النهائي، وخاصةً إذا تم استرداد المنتج بطريقةٍ انتقائية. ومع ذلك، لكي تكون إزالة المنتج في

الموقع ناجحة فإن تقييم تقنية الفصل لمدى ملاءمتها للتكامل مع المفاعل الحيوي دون أي تأثير سلبي على العملية (على سبيل المثال، السمية للخلايا أو تغير طبيعة الإنزيمات) يكون شرط مسبق مهم.

ويقدم هذا الفصل لمحة عامة عن وحدات التشغيل التي تستخدم للفصل في التقنية الحيوية تليها أمثلة لبعض عمليات التجهيز النهائي لبعض المنتجات المعروفة جيداً.



الشكل رقم (٢ ,٨). مفهوم استرداد المنتج في الموقع (ISPR). يتم حصد المنتج باستمرار أو بشكلٍ متقطع من المفاعل الحيوي باستخدام تقنية فصل مناسبة. ويمكن إزالة المحفز الحيوي أو الخلايا الكاملة المستخدمة في العملية من تيار العملية وإعادة تدويرها قبل خطوة أسر المنتج.

(٢ ,٨) الفصل في التقنية الحيوية الصناعية Separations in Industrial Biotechnology

يمكن تصنيف مختلف وحدات تشغيل عمليات التجهيز النهائي المستخدمة في التقنية الحيوية على أساس القوة الدافعة للفصل كما هو مبين في الجدول رقم (١ ,٨). إن كثيراً من التقنيات هي عمليات وحدات تقليدية معروفة جداً تم تكييفها من قبل الصناعة الكيميائية والصيدلانية وأيضاً الصناعات الغذائية. ومع ذلك فقد تم تطوير وتنقيح بعض التقنيات لتلبية احتياجات التقنية الحيوية الصناعية. وفي هذا الصدد، فإنه تجدر الإشارة إلى الفصل القائم على الأغشية والفصل اللوني. وقد جعلت التطورات في تقنية الأغشية وظيفة الأغشية متنوعة للغاية، مما يسمح بفصل مجموعةٍ واسعة من المنتجات اعتماداً على مبادئ فصل مختلفة. وبالمثل يعتمد الفصل اللوني السائل على قوى فصل مختلفة ويستخدم على نطاقٍ واسع في مجموعة متنوعة من الأساليب لفصل كلٍ من الجزيئات الصغيرة والجزيئات الكبيرة.

(١ ,٢ ,٨) فصل الجسيمات الصلبة Separation of Solid Particles

إن فصل السائل عن الصلب هو وحدة التشغيل الرئيسة السائدة في عملية التجهيز النهائي ويتضمن إزالة الكتلة الحيوية للخلايا من محلول التخمير، وبقايا الخلايا بعد تمزيق الخلايا في حالة المنتجات داخل الخلية،

والمحفزات الحيوية المقيدة، ولكنه يستخدم أيضاً خلال المراحل المتوسطة والنهائية لفصل الرواسب والبلورات [٧، ٨]. وغالباً ما يتم الاختيار بين الطرد المركزي والترشيح (وفي الآونة الأخيرة الترشيح الدقيق)، ومع ذلك فقد تم استخدام عدد من التقنيات الأخرى ذات آليات فصل مختلفة أيضاً إلى حدٍ ما.

الجدول رقم (١ ,٨). تصنيف تقنيات الفصل المستخدمة على أساس خصائص المنتج النوعية.

مبدأ الفصل	تقنية الفصل	التطبيق في عملية التجهيز النهائي
الحجم	الترشيح	فصل الكتلة الحيوية للخلايا، البقايا، المحفزات الحيوية المقيدة، الرواسب والبلورات
	الترشيح الدقيق	فصل الكتلة الحيوية للخلايا
	الترشيح الفائق	تركيز البروتينات، نزع الأملاح
	الترشيح النانوي/ الأسموزية العكسية	إزالة المواد المذابة الصغيرة، نزع الأملاح
فرق الكثافة	الطرد المركزي	فصل الكتلة الحيوية للخلايا، البقايا، المحفزات الحيوية المقيدة، الرواسب والبلورات
التطاير	التقطير (التفريغي)، التجريد الغازي	استرداد المنتجات المتطايرة صغيرة الوزن الجزيئي
التطاير + النفاذية الغشائية	التبخير المسبق، التقطير عابر الأغشية	
الذوبان	استخلاص السائل من السائل، استخلاص السائل بدرجات الحرارة فوق الحرجة	استرداد المنتجات غير القطبية (والمشحونة) صغيرة الوزن الجزيئي
	الاستخلاص المائي ثنائي المرحلة	استرداد البروتينات
	الترسيب	تركيز وتنقية المنتجات والبروتينات صغيرة الوزن الجزيئي
	البلورة	تنقية وتشكيل المنتجات والبروتينات صغيرة الوزن الجزيئي
الشحنة	تبادل الأيونات	تركيز وتنقية المنتجات صغيرة وكبيرة الوزن الجزيئي المشحونة
	الفصل الغشائي الكهربي	تنقية الأحماض العضوية
طبيعة التفاعل مع الماء	المرحلة العكسية	تنقية المواد المذابة غير القطبية
	الفصل اللوني الكاره للماء	تنقية البروتينات
التعرف الجزيئي	الفصل اللوني الانجذابي	التنقية الاختيارية للبروتينات
	التبصيم الجزيئي	فصل المركبات المتماثلة تركيبياً، النظائر الضوئية، ...إلخ

(١ , ١ , ٢ , ٨) الترشيح Filtration

إن الترشيح هو الوسيلة الأكثر فعالية من حيث التكلفة لفصل الجزيئات الصلبة الكبيرة من معلق. يؤدي مرور معلق للجسيمات خلال بيئة ترشيح مسامية إلى ترسيب الجسيمات وتشكيل كعكة على سطح المرشح والتي يزيد حجمها مع الوقت. ويرتبط معدل الترشيح عند أي وقت بعوامل مختلفة مثل:

$$\frac{\mathrm{d}V}{\mathrm{d}t} = \frac{\Delta pA}{\alpha\mu m + \mu r_{\mathrm{m}}} \qquad (٨,١)$$

حيث V هي حجم الرشيح، t هي زمن الترشيح، A هي مساحة المرشح ، Δp هي فرق الضغط خلال المرشح، μ هي اللزوجة الديناميكية، m الكتلة الكلية للكعكة، α هو متوسط مقاومة الكعكة النوعية و r_m هي مقاومة بيئة المرشح. وترتبط كتلة الكعكة المترسبة لكل وحدة مساحة بتركيز المواد الصلبة C في المعلق، أي أن mA = CV.

وغالباً ما تكون قيمة r_m جديرة بالاهمال بالمقارنة مع α، والتي تعتمد على شكل وحجم الجسيمات، وحجم المساحات الخلالية بينهما، والثبات الميكانيكي للكعكة. وإذا كانت كعكة المرشح غير قابلة للانضغاط، فإن α لا تتغير مع انخفاض الضغط عبر المرشح. ومع ذلك، فإن كعكات المرشح التي يتم الحصول عليها من محاليل التخمير تكون قابلة للانضغاط، مما يسبب انخفاضاً في معدلات الترشيح. ويمكن خفض مقاومة الكعكة النوعية عن طريق زيادة مسامية الكعكة، وتغيير الشكل، أو زيادة متوسط حجم الجسيمات [٩]. وتستخدم أدوات الترشيح مثل الثري الدياتومي على نطاقٍ واسع لتحسين كفاءة الترشيح. ويمكن استخدام أدوات الترشيح بوصفها غطاءً أولياً على بيئة المرشح لمنع انسداد المرشح من قبل المواد الصلبة، ويمكن أيضاً اضافتها إلى محلول التخمير لزيادة مسامية الكعكة. ويعد تسخين محلول التخمير لإفساد البروتينات أو إضافة المحاليل المنحلة بالكهرباء لتعزيز تخثر الغرويات إلى جسيمات أكبر وأكثر كثافة من الوسائل الأخرى من المعالجة الأولية لتحسين خصائص الترشيح للمحاليل.

يمكن تشغيل الترشيح في أسلوبين- عند ضغط ثابت (تفريغ) حيث ينخفض معدل الترشيح تدريجياً مع زيادة مقاومة الكعكة، أو عند معدل ثابت حيث يتم الحفاظ على معدل التدفق عن طريق زيادة فرق الضغط تدريجياً. والترشيح عند ضغط ثابت هو طريقة الترشيح الأكثر شيوعاً، حيث تكون V و t هي المتغيرات فقط. وتعطي إعادة ترتيب المعادلة (٨ , ١) والتكامل من V = صفر إلى V = V و t = صفر إلى t = t:

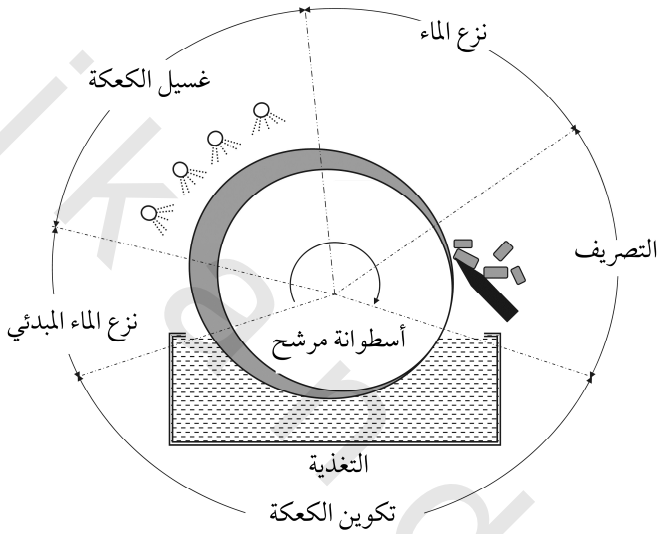
$$\frac{\mathrm{d}t}{\mathrm{d}V} = \frac{\alpha\mu CV}{A^2\Delta p} + \frac{\mu r_{\mathrm{m}}}{A\Delta p} \qquad (٨,٢)$$

$$\frac{t}{V} = \frac{\alpha\mu C}{2A^2\Delta p}V + \frac{\mu r_{\mathrm{m}}}{A\Delta p} \qquad (٨,٣)$$

obeikandl.com

ويمكن تبسيط المصطلحات $\alpha\mu CV/(2A^2\Delta p)$ و $\mu r_m/A\Delta p$ أكثر إلى K1 و K2، على التوالي. K1 و K2 هما ثابتان خلال الترشيح بالضغط الثابت ومن ثم يعطي رسم t/V مقابل V خط مستقيم، حيث يعتمد المنحدر K1 على فرق ضغط الترشيح وخصائص الكعكة ويعتمد الاعتراض K2 أيضاً على فرق الضغط ولكنه لا يعتمد على خصائص الكعكة [١٠].

وعادةً ما يتم الترشيح كبير المستوى لمحاليل التخمير التي تحتوي على الخيوط الفطرية باستخدام مرشحات تفريغية مثل مرشح تفريغ الأسطوانة الدوارة المبين في الشكل رقم (٣,٨).

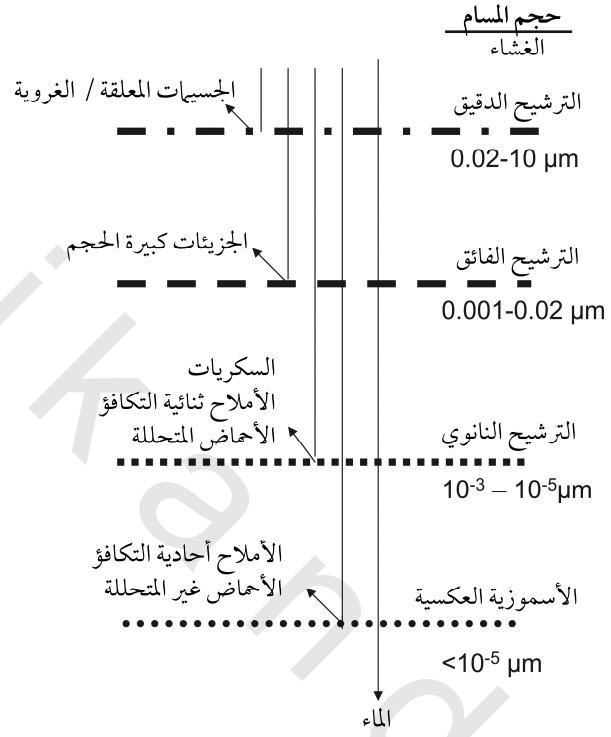


الشكل رقم (٣,٨). مرشح تفريغ الأسطوانة الدوارة وعمله. تضم المعدة أسطوانة دوارة مغطاة بمرشح مغمور جزئياً في خزان من محلول جسيمات. يتم إبقاء الأسطوانة تحت ضغط داخلي منخفض وإدارتها بسرعة بطيئة، ويتم التقاط الكتلة الحيوية المترسبة ككعكة على سطح المرشح. الدوران المستمر للأسطوانة يسمح بنزح المياه، وغسل، وتجفيف كعكة المرشح قبل الخروج من على سطح الأسطوانة. وعادةً ما تتم تغطية المرشح بمساعد للترشيح.

(٨,٢,١,٢) الترشيح الدقيق Microfiltration

شهد العقد الماضي زيادةً هائلة في استخدام الترشيح الغشائي لفصل الجسيمات والجزيئات، حيث يشكل غشاء شبه نفاذ بيئة المرشح ويكون فرق الضغط الهيدروليكي بين جانبي محلول التغذية ومحلول الرشيح هو القوة الدافعة للترشيح. وتتم تسمية عمليات الترشيح الغشائي تبعاً لحجم مسام المرشح: يستخدم الترشيح الدقيق على نطاقٍ واسع لفصل الخلايا مثل إيشيريشيا القولون والخمائر خلال مراحل الاسترجاع الأولية من عمليات التجهيز النهائي (الشكل رقم ٨,٤). ويمكن استخدام الأغشية دقيقة المسام التي يقع نطاق حجم مسامها بين ٠,٠٢–٠,٢ ميكروميتر لفصل الخلايا البكتيرية، في حين يمكن استخدام المسام من ٠,٢–٢ ميكروميتر مع الخمائر [١٢].

وفي الواقع يمكن أن تشكل وحدة الترشيح الدقيق جزءاً لا يتجزأ من المفاعل الحيوي للاحتفاظ بالخلايا الكاملة أو المحفزات الحيوية المقيدة في حين يتخلل المنتج من خلال الغشاء لإتاحة عملية إزالة المنتج في الموقع. وسيتم وصف الترشيح الغشائي بمزيدٍ من التفصيل في القسم (١ ,٣ ,٢ ,٨).



الشكل رقم (٤ ,٨). أنواع عمليات الترشيح الغشائي المستخدمة في التقنية الحيوية للفصل تبعاً للحجم [١١].

(٨ ,٢ ,١ ,٣) الطرد المركزي Centrifugation

يستخدم الطرد المركزي لفصل المواد التي تختلف في الكثافة تحت تأثير قوة أكبر من الجاذبية. ويتراوح حجم الجزيئات التي يتم فصلها بالطرد المركزي ما بين ١٠٠ و١ ,٠ ميكروميتر. وحتي يتم فصل جسيم كروي من معلق مخفف، فإنه يتم إعطاء السرعة النهائية للفصل، Vc في مجال طرد مركزي عن طريق قانون ستوكس:

$$V_c = \frac{r\varpi^2 D_p^2(\rho_p - \rho_f)}{18\mu} \qquad (٨ ,٤)$$

حيث يستبدل تسارع الطرد المركزي rω2 (r هي المسافة القطرية من محور الدوران وω هي السرعة الزاوية للدوران) تسارع الجاذبية g التي تؤثر في معدل الترسيب Vg في مجال الجاذبية. وفقاً للمعادلة (٤ ,٨)، تزيد سرعة الجسيمات في جهاز الطرد المركزي مع زيادة قطر الجسيمات D_p، وزيادة فرق الكثافة بين الجسيمات (ρ_p) والقطر (ρ_f)، وخفض لزوجة المعلق μ. وتسمى نسبة السرعة في أجهزة الطرد المركزي إلى السرعة تحت تأثير الجاذبية بتأثير جهاز الطرد

المركزي أو رقم g ويعطي كـ Z = rω2/g. وأجهزة الطرد المركزي الصناعية لها عامل Z يتراوح من ٣٠٠-١٦٠٠٠، في حين يصل عامل Z في أجهزة الطرد المركزي المعملية الصغيرة إلى ٥٠٠٠٠٠.

يتطلب الطرد المركزي معدات أكثر تكلفة من الترشيح ويتميز أيضاً بارتفاع استهلاك الطاقة؛ ولكن هذه التقنية فعالة في الجزيئات الصغيرة الصعب ترشيحها. وينتج عن الطرد المركزي للخلايا من محلول التخمير عجين سميك مركز يحتوي على سائل أكثر مما في كعكة المرشح، ولا يخلو المحلول الطافي من الخلايا. وكما هو الحال في الترشيح، فإن المعالجة المسبقة للمحلول، على سبيل المثال عن طريق إضافة عوامل التلبد مثل الكاتيونات الكثيرة والأملاح غير العضوية، وما إلى ذلك، تزيد من سهولة فصل الخلايا عن طريق الطرد المركزي.

وغالباً ما يتم الطرد المركزي على النطاق الواسع في حالة مستمرة باستخدام أنواع مختلفة من أجهزة الطرد المركزي ومن بينها جهاز الطرد المركزي ذو الأقراص المتراصة وجهاز الطرد المركزي الساكب أو الحلزوني الأكثر استخداماً على نطاقٍ واسع في مجال التقنية الحيوية (الشكل رقم ٨,٥). ولأنه يمكن القيام بالطرد المركزي تحت ظروف معقمة، فإنه يمكن دمجه مع عملية التخمير في عملية إزالة للمنتج في الموقع بحيث يمكن معالجة السائل المروق لاسترداد المنتج في حين تتم إعادة تدوير الكتلة الحيوية إلى المخمر.

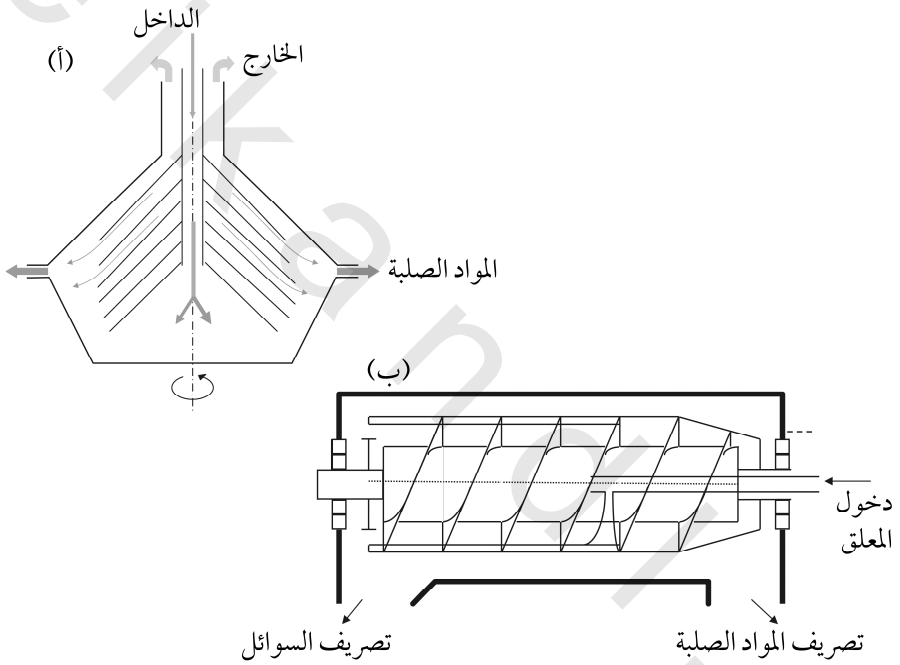
(٨,٢,١,٤) الهيدروسيكلون Hydrocyclone

توجد أمثلة لفصل المواد الصلبة من السائلة باستخدام الهيدروسيكلون (الشكل رقم ٨,٦)، والذي على عكس أجهزة الطرد المركزي لا يوجد به أجزاء متحركة وتتم الحركة الدوامية بواسطة السائل نفسه والذي يتم إدخاله بشكل تماسي إلى الجزء العلوي من الجهاز، مما يعطيه حركة هبوطية دوامية قوية [٨]. ويهرب جزء صغير فقط من المحلول المغذي من خلال التيار السفلي، حاملاً الجزيئات الأكثر كثافة، في حين يعكس معظم السائل اتجاهه ويرتفع في حركة دوامية أقوى ويخرج من أنبوب التيار العلوي، حاملاً معه الجزيئات الأخف وزناً.

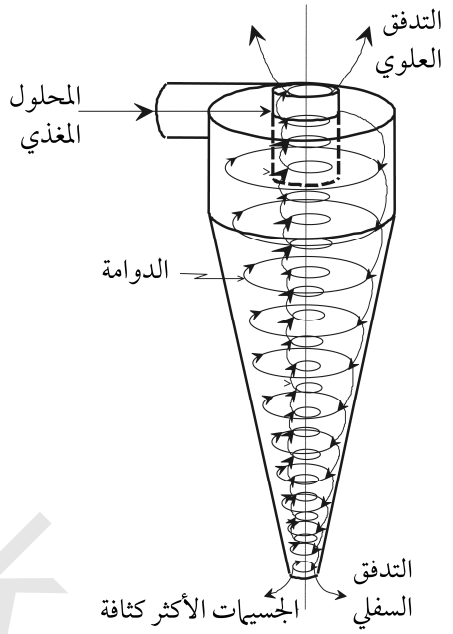
(٨,٢,١,٥) التعويم والاستخلاص Flotation and Extraction

يشمل التعويم والاستخلاص وحدات تشغيل أخرى أقل تقليدية لكنها فعالة جداً في إزالة الخلايا وبقايا الخلايا التي قد يكون من الصعب فصلها عن طريق الطرد المركزي أو الترشيح. وفي التعويم يتم حمل الجزيئات بواسطة فقاعات الهواء إلى أعلى عمود التعويم حيث يتم كشطها في شكل زبد، وهذه العملية مفيدة خاصةً في فصل الجسيمات الدقيقة. ويتيح استخدام فقاعات الغاز المصنوعة من محلول المواد المقللة للتوتر السطحي أو فقاعات الغاز الدقيقة للمواد الغروية الفصل الفعلي للكائنات الحية الدقيقة من المحلول المخفف [١٣].

يتيح الاستخلاص في النظم المائية ثنائية المرحلة (ATPS) سهولة فصل الجزيئات من المحاليل المغذية التي تكون عالية اللزوجة أو ذات توزيع غير متجانس من الجسيمات [١٤]. ويتم تكوين هذه النظم عن طريق خلط اثنين من البوليمرات المختلفة أو بوليمر وملح أعلى من تركيز معين في الماء؛ ويتم تخصيب المرحلتين بالنسبة لكل مكون في المرحلة المعنية. وعادةً ما يكون تقسيم الجسيمات في مثل هذه النظم أحادي الجانب، وقد استخدمت هذه التقنية لاستخلاص البروتينات مباشرةً من متجانس الخلايا الخام بحيث يتم تخصيب الجسيمات في مرحلة القاع في حين يتم الحصول على المنتج المستهدف في مرحلة القمة (انظر القسم ٨,٢,٥,١). ويمكن إجراء مثل هذا الفصل بسرعةٍ كبيرة تحت الجاذبية أو سرعات طرد مركزي منخفضة.



الشكل رقم (٨,٥). عرض تخطيطي لنوعين من أجهزة الطرد المركزي المستخدمة في التقنية الحيوية. (أ) يحتوي جهاز الطرد المركزي ذو الأقراص المتراصة على عدة أقراص (بين ٣٠ و٢٠٠) موضوعة بزاوية من ٣٥-٥٠ درجة ومفصولة عن بعضها بمسافة ٠,٤-٢ مم، مقسمةً الوعاء إلى مناطق ترسيب منفصلة. يدخل المحلول المغذي جهاز الطرد المركزي من خلال أنبوب تغذية مركزية أسفل الأقراص. تترسب المواد الصلبة على سطح كل قرص وتتحرك نحو محيط الوعاء الخارجي، في حين يتحرك السائل المروق نحو الداخل صاعداً إلى أنابيب المحلول الخارج حول الأنبوب المغذي. (ب) يتم استخدام جهاز الطرد المركزي الساكب أو الحلزوني لتركيز العجائن مع تركيزات عالية من المواد الصلبة الجافة. مأخوذ بتصريح من هاتي-كول وماتياسون [١]، مطبعة جامعة كامبريدج. وهو يتألف من وعاء أفقي دوار مدبب في إحدى نهاياته ومرتبط بمسمار لولبي يدور بسرعة مختلفة قليلاً. تترسب المواد الصلبة على جدار الوعاء ويتم كشطها بواسطة المسمار وإخراجها من النهاية الضيقة للوعاء.



الشكل رقم (٨,٦). عرض تخطيطي لفصل المواد الصلبة من السائلة في الهيدروسيكلون. تضم الوحدة جزء مخروطي مع فتحة سفلي تتصل برأس أسطوانية مرتبطة بمدخل تماسي ومغلقة بلوحة نهائية ذات أنبوب للتيار العلوي مركبة محورياً [٨].

(٨,٢,٢) تمزيق الخلايا لتحرير المنتجات المرتبطة بالخلية

Cell Disruption for Release of Cell-Associated Products

تشمل الإستراتيجيات المختلفة التي يمكن استخدامها لتمزيق الخلايا الميكروبية كسر هيكل الخلية بواسطة القوة الميكانيكية، متلفةً جدار الخلية على وجه الخصوص، على سبيل المثال عن طريق التجفيف أو التحليل الإنزيمي، أو تحليل الأغشية في المقام الأول (على سبيل المثال، عن طريق المعالجة بالمواد الكيميائية) [٧، ١٥، ١٦]. والتمزيق الميكانيكي هو الوسيلة الأكثر شيوعاً لتحرير المنتجات التي تكون داخل الخلايا، والذي يتم تحقيقه على النطاق الصناعي عن طريق التجانس تحت ضغط عالٍ أو التقليب القوي مع المواد الكاشطة. ويتبع التمزيق عملية من الدرجة الأولى، ويتم تمثيل درجة تحرير المنتج في جهاز تجانس تحت ضغط عالٍ عن طريق:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = kNP^a \qquad (٨,٥)$$

حيث تكون R، R_m هي أقصى كمية للمنتج متاحة للتحرير والكمية المحررة عند وقت معين، على التوالي (كجم منتج/ كجم خلايا)، k هو ثابت تفاعل من الدرجة الأولى، N هو عدد مرات المرور، P هو ضغط التشغيل وa هو أس الضغط.

ويمكن تمزيق الخلايا بطريقة غير ميكانيكية من خلال طرق فيزيائية وكيميائية، أو إنزيمية. ومن بين تقنيات التمزيق الفيزيائية التقليدية التجفيف تحت ضغط ثم استخلاص المسحوق الميكروبي، والتجميد والذوبان المتكرر لمعلق الخلية، والصدمة التناضحية. ويمكن أن يكون التعرض لدرجات الحرارة العالية طريقة فعالة لتمزيق الخلايا ولكنه يقتصر على المنتجات المستقرة حرارياً.

ويتم إجراء تمزيق/ تنفيذ الخلايا بمواد كيميائية مختلفة مثل القلويات، والـ EDTA، والمذيبات، والمنظفات، والمضادات الحيوية، وما إلى ذلك، ولكن تم تطبيق عدد قليل منها فقط لتحرير المنتج نظراً لقضايا التكلفة، والسلامة، أو التأثير على ثبات المنتج. والتحلل الإنزيمي للخلايا له مزايا من حيث الانتقائية والشروط المعتدلة المطلوبة لتحرير المنتج. والإنزيم المستخدم على نطاقٍ واسع لتحليل البكتيريا هو الليزوزيم، بينما تستخدم الجلوكانيزات والمانانيزات والبروتييزات في الخمائر. وتجعل تكلفة الإنزيمات التحليل الإنزيمي أكثر تكلفة من التمزيق الميكانيكي للخلايا. وقد اقترح مزيج من المعالجة الإنزيمية/ الكيميائية والحرارية مع التحليل الميكانيكي لتعزيز كفاءة هذه الطرق، مع توفير الوقت والطاقة وتيسير عمليات التجهيز النهائي اللاحقة [١٧]. ويلي تمزيق الخلايا خطوة صلبة–سائلة لإزالة بقايا الخلية.

(٨,٢,٣) فصل الجزيئات اعتماداً على الحجم Size-Based Separation of Molecules

كثيراً ما يتم فصل الجزيئات اعتماداً على الحجم خلال عملية التجهيز النهائي من أجل تركيز المنتج، أو لإزالة الملوحة وتبادل المحلول المنظم. وتؤدي الأغشية دوراً سائداً في مثل هذا الفصل. وغالباً ما تتم إزالة الأملاح من الأحجام الصغيرة لمحاليل البروتين عن الفصل الغشائي باستخدام غشاء للفصل، تتحرك المواد المذابة منخفضة الوزن الجزيئي من منطقة التركيز الأعلى إلى التركيز المنخفض، وعند التوازن يتساوى الجهد الكيميائي للمركبات المنتشرة على جانبي الغشاء.

(٨,٢,٣,١) الترشيح الغشائي Membrane Filtration

يستخدم الترشيح الغشائي باستخدام أغشية ذات حجم مسام أقل من الترشيح الدقيق وذلك لفصل الجزيئات عالية ومنخفضة الوزن الجزيئي (الشكل رقم ٨,٤). يفصل الترشيح الفائق المواد المذابة البوليمرية في النطاق من ٠,٠٠١–٠,٠٢ ميكروميتر وغالباً ما يستخدم لإزالة المواد المذابة منخفضة الوزن الجزيئي من الجزيئات الكبيرة وكطرق لتركيز محاليل البروتين بعد الترويق باستخدام الترشيح الدقيق [٧، ١١]. ويتأثر التدفق الفعلي خلال الغشاء بالضغط عبر الغشاء (Δp) إلى جانب خصائص الغشاء وخصائص تدفق السائل. ومع ذلك،

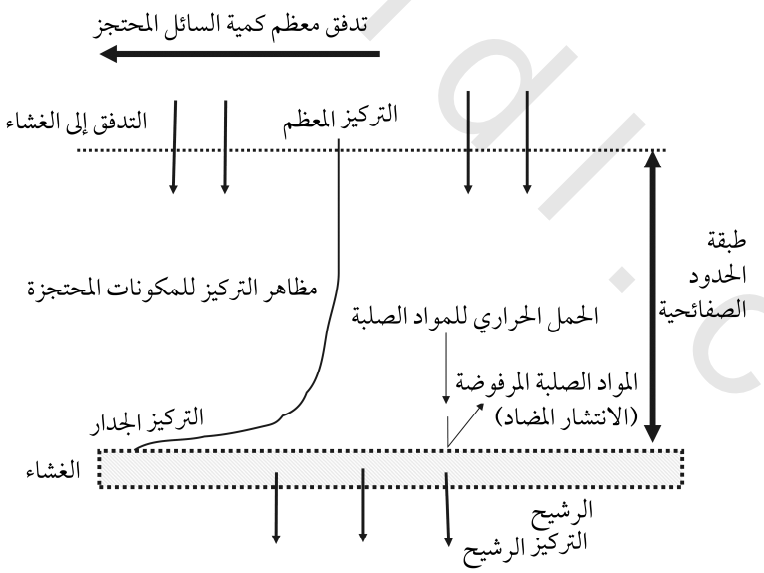
فإنه خلال الترشيح الفائق كما في الترشيح الدقيق، فإن الضغط عبر الغشاء يؤدي فقط دوراً إلى حدٍ معين. ومع الوقت يرتفع تركيز المواد المذابة عالية الوزن الجزيئي على سطح الغشاء، مؤدياً إلى ظاهرة تعرف باسم الاستقطاب التركيزي، ويتحدد التدفق بواسطة توازن تدفق الحمل الحراري إلى سطح الغشاء من البروتين وتدفقه العكسي إلى الجزء الأكبر من السائل نتيجة لاختلاف التركيز (الشكل رقم ٨,٧). ويمكن استنتاج تدفق الغشاء الناتج J على النحو التالي:

$$J = K' \ln \frac{C_{wall} - C_{permeate}}{C_{bulk} - C_{permeate}} \qquad (٨,٦)$$

حيث K' هو معامل نقل الكتلة ويساوي D_e /δ (D_e هي الانتشارية الفعالة للمذاب في طبقة السائل وδ هي سمك الطبقة)؛ وتكون C_{wall}، C_{bulk}، $C_{permeate}$، هي تركيز البروتين عند الجدار، الجزء الأكبر من السائل، والرشيح، على التوالي. وحيث إن $C_{bulk} > C_{permeate}$،

$$J = K' \ln \frac{C_{wall}}{C_{bulk}} \qquad (٨,٧)$$

وبذلك في حالة الاستقطاب التركيزي يكون التدفق مستقلاً عن الضغط عبر الغشاء ويعتمد على نسبة C_{wall} إلى C_{bulk}.



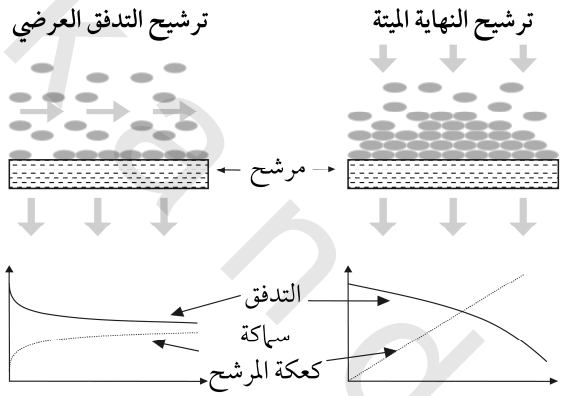
الشكل رقم (٨,٧). الاستقطاب التركيزي خلال الترشيح الدقيق/ الفائق. يزيد تركيز البروتينات والمواد المذابة الأخرى الكارهة للماء على سطح الغشاء مع الوقت، منتجاً انتشاراً عكسياً إلى الجزء الأكبر من السائل ومحداً من تدفق الرشيح خلال الغشاء [١٠].

obeikandi.com

وقد تم تبني ترشيح التدفق العرضي أو التماسي كطريقةٍ طبيعيةٍ للترشيح الغشائي حيث يتم توجيه الضغط بصورة غير عمودية على سطح الغشاء (كما في حالة ترشيح النهاية الميتة) ولكن بصورة متوازية له (الشكل رقم ٨,٨). ويوفر وضع الترشيح هذا قوة اجهاد قريبة من سطح الغشاء كافية لتقليل ترسيب الجسيمات والحد من امتصاص المواد المذابة الكارهة للماء والفساد الغشاء الناتج. ويعطي التدفق في ترشيح التدفق العرضي كدالة للضغط عبر الغشاء بالمعادلة:

$$J = \frac{\Delta p}{R_G + R_M} \qquad (٨,٨)$$

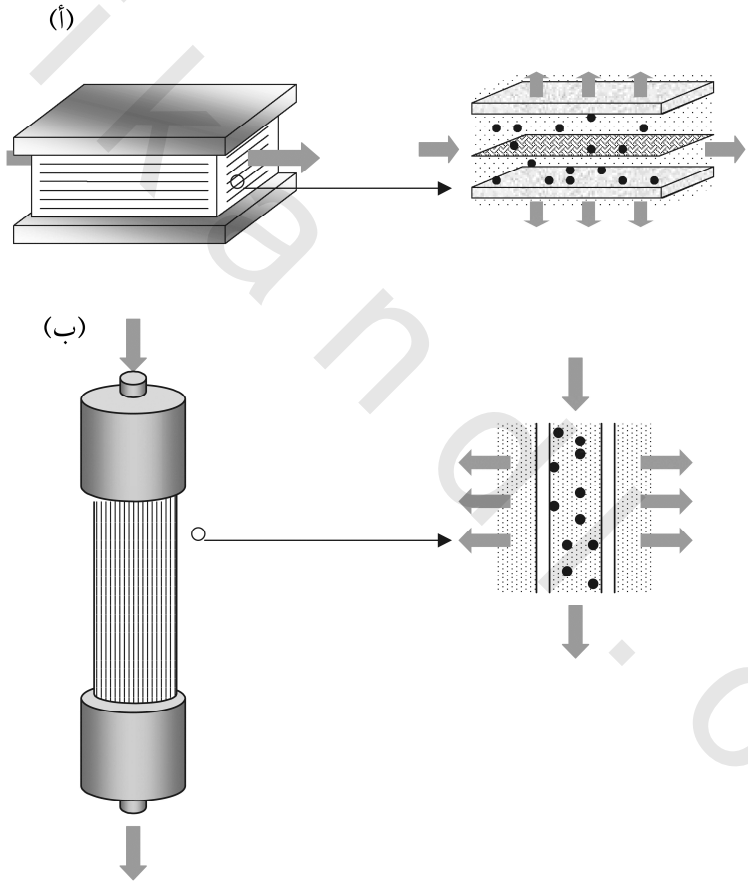
حيث R_G وR_M هي مقاومة الهلام والغشاء، على التوالي. تكون R_M ثابتاً في حين تتغير R_G مع تركيز المذاب والسرعة التماسية عبر الغشاء. ويمكن تعظيم معدل الترشيح عند السرعة المثلى للسائل.



الشكل رقم (٨,٨). مقارنة ترشيح التدفق العرضي مع ترشيح النهاية الميتة. يكون تدفق السائل عمودياً على سطح الغشاء في ترشيح التدفق العرضي، مما يؤدي إلى تقليل فساد الغشاء وانخفاض أقل في التدفق مقارنةً مع ترشيح النهاية الميتة التي يكون فيها تدفق السائل عمودياً على سطح الغشاء.

وتتوافر الآن أغشية كلٍ من الترشيح الدقيق والفائق في مواد مختلفة توفر تدفق خلالي جيد وهي سهلة التنظيف. وتتوفر وحدات الترشيح الغشائي على صورتين رئيستين: خراطيش أنبوبية (على سبيل المثال، الألياف الجوفاء) ووحدات لوحات مسطحة والتي يمكن أن تتخذ شكل نظام لوحة وإطار أو صورة دوامة حلزونية. وتستخدم نظم الألياف الجوفاء واللوحة والإطار عادةً لمعالجة المحاليل المغذية الخام (الشكل رقم ٨,٩). وتسمح هذه النظم بالمعالجة الدفعية أو المستمرة على حدٍ سواء للمحلول المغذي. ويعتمد نظام الألياف الجوفاء على التدفق الصفحي للحد من طبقة الهلام في حين تستخدم نظم اللوحة والإطار حواجز بين الأغشية لتوليد تدفق مضطرب وتقليل الفساد.

والتناضح العكسي والترشيح النانوي هما العمليتين الغشائيتن الأخرتين اللتان تجذبا الاهتمام لإزالة المواد المذابة الأيونية الأصغر من ٠,٠٠١ ميكروميتر عادةً. وهذه التقنيات غير شائعة الاستخدام للفصل في التقنية الحيوية، ومع ذلك فهي تستخدم على نطاقٍ واسع في تنقية المياه، في حين يستخدم الترشيح النانوي أيضاً لتليين المياه. وتتشابه التقنيتان إلى حدٍ ما في التشغيل، والفارق الأساسي هو أن الترشيح النانوي يتم عند ضغط أقل انخفاضاً وذو انتقائية رفض أقل. ويزيل التناضح العكسي الأيونات أحادية التكافؤ بمستوى ٩٨-٩٩٪ عند ٢٠٠ رطل لكل بوصة مربعة، وتتراوح إزالة الأيونات أحادية التكافؤ بواسطة غشاء ترشيح نانوي بين٥٠٪ و٩٠٪ اعتماداً على مواد وتصنيع الغشاء.



الشكل رقم (٩,٨). نظم ترشيح التدفق العرضي: (أ) نظام اللوحة والإطار ذو أغشية متراصة تتخللها فواصل، و(ب) خرطوشة ألياف جوفاء تضم حزمة من شعيرات غشائية في وحدة أنبوبية. ويتم حجز الجسيمات والجزيئات الأكبر من حجم مسام الغشاء على الغشاء في حين تمر المواد المذابة الأصغر عبر الغشاء.

obeikandl.com

ويستخدم ضغط معادل أو أكبر قليلاً من الضغط التناضحي لدفع جزيئات المذيب والمذاب عبر الغشاء [١٢]. ويتم التعبير عن تدفق المذيب والمذاب على النحو التالي:

$$N_1 = K_p(\Delta p - \pi) \qquad (٨,٩)$$

$$N_2 = C(1-\sigma)N_1 + K_{p'}\Delta C \qquad (٨,١٠)$$

حيث K_p و $K_{p'}$ هما معاملي النفاذية للمذيب والمذاب على التوالي، π هي الضغط التناضحي، وC متوسط تركيز المذاب في المحلول، ΔC هو فرق تركيز المذاب عبر الغشاء، وσ هي معامل الانكسار لجزيئات المذاب، وهو الجزء من جزيئات المذاب الذي يتم الاحتفاظ به على جانب واحد من الغشاء في وجود تدفق من المذيب.

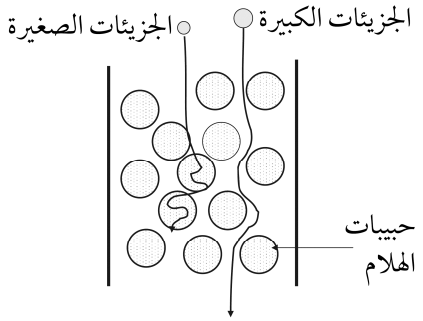
(٨,٢,٣,٢) الفصل اللوني باستبعاد الحجم Size Exclusion Chromatography

إلى جانب الترشيح الغشائي، فإن الفصل اللوني في صورة الفصل اللوني باستبعاد الحجم (المعروف أيضاً بالترشيح الهلامي) يعدُّ أيضاً تقنية فصل تعتمد على الحجم وتستخدم عادةً في المراحل الأخيرة لتنقية البروتينات [١٨]. ويتم الفصل على أساس الفترات الزمنية المختلفة التي تحتاجها الجزيئات ذات الأحجام المختلفة لتمر عبر مسام مصفوفة هلام فصل لوني معبأة في عمود. ويتم استبعاد الجزيئات الأكبر من حجم مسام المصفوفة من المسام وبالتالي يتم إزالتها بسرعة من العمود في الحجم الفارغ (خارج الجسيمات) بينما تتم إزالة الجزيئات الأصغر حجماً اعتماداً على وقت عبورها خلال المسام (الشكل رقم ٨,١٠). وتزال المواد المذابة التي تستبعد جزئياً فقط من المرحلة الثابتة في حجم يوصف بالمعادلة التالية:

$$V_e = V_o + K_p V_i \qquad (٨,١١)$$

حيث V_e، V_o، و V_i هي الحجم المزال، والحجم الفارغ، وحجم السائل الداخلي في مسام الجسيمات، على التوالي، وK_p هو معامل تقسيم الهلام المعرف بأنه الجزء من الحجم الداخلي المتاح للمذاب. وللجزيئات الكبيرة فإن K_p = صفر.

ويتم تقييد الفصل اللوني باستبعاد الحجم اللوني بالقدرة المنخفضة، أي أن حجم العينة يكون حوالي ٢-٥٪ من حجم عمود الفصل اللوني، ويتم تحسين الفصل من خلال زيادة ارتفاع العمود وإجرائه عند معدلات تدفق منخفضة. وينتج عن هذه التقنية المزيد من التخفيف للمنتج.



الشكل رقم (٨,١٠). الفصل اللوني باستبعاد الحجم لفصل الجزيئات المتفاوتة في الحجم. تضم المرحلة الثابتة مصفوفة ذات مدى حجم مسام محدد للسماح بمرور الجزيئات الصغيرة إلى المسام وتؤخر مرورها عبر العمود، في حين يتم استبعاد الجزيئات الأكبر وتمر دون عوائق من خلال العمود مع الطور المتحرك.

(٨,٢,٤) الفصل اعتماداً على تطاير المنتج Separations Based on Product Volatility

يمكن استخدام إزالة المنتج كبخار للتركيز وكوسيلة لفصله وتنقيته على حدٍ سواء. وغالباً ما يكون هذا الفصل مطلوباً أيضاً للإزالة المستمرة للمذيب أو الماء الناتج كمنتج ثانوي في العملية، وفي مثل هذه الحالة يجب أن يتم التكامل مع المفاعل الحيوي.

(٨,٢,٤,١) التقطير Distillation

على الرغم من أنها عملية كثيفة الاستخدام للطاقة، إلا أن التقطير كان هو الطريقة المتاحة لاسترداد المنتجات المتطايرة مثل الإيثانول من الكميات الكبيرة من المحاليل المائية المغذية. وإذا تواجد أكثر من منتجٍ واحد متطاير في المحلول المغذي، فإنه يتم فصلهما بواسطة التقطير التجزيئي. ويستخدم التقطير التفريغي لتسهيل التقطير عند درجات الحرارة المنخفضة، على سبيل المثال عند درجة حرارة عملية التخمير، عن طريق تقليل الضغط فوق خليط السائل المراد تقطيره إلى أقل من ضغط بخاره. وقد استخدمت هذه الطريقة لاسترداد الإيثانول مباشرةً من المخمر وأيضاً لمعالجة المواد الحساسة لدرجة الحرارة مثل البيتا-كاروتين لإزالة المذيبات دون ضرر لا مبرر له.

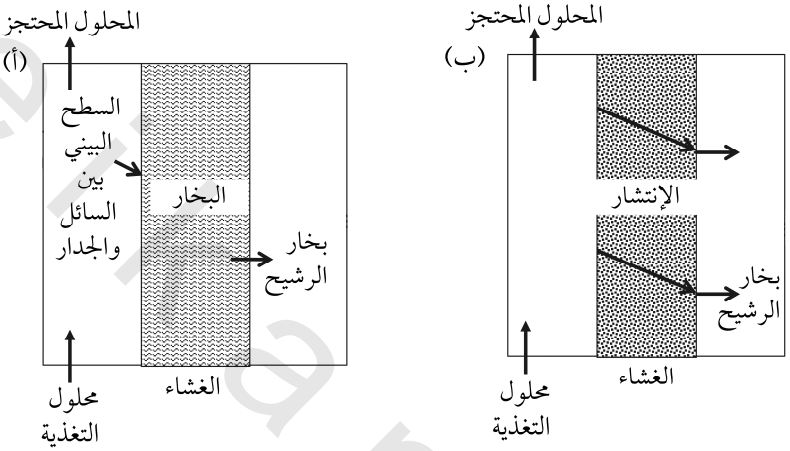
(٨,٢,٤,٢) التجريد الغازي Gas Stripping

يعدُّ التجريد الغازي بديلاً للتقطير حيث يتم إمرار غاز خلال المفاعل الحيوي لإزالة المنتج المتطاير، والذي يتم تكثيفه بعد ذلك واسترداده [١٩]. وتعدُّ الطريقة بسيطة، ولا تتطلب أجهزة باهظة الثمن. وعلاوةً على ذلك، لا يؤدي التجريد الغازي إلى إزالة المواد المغذية والمركبات الوسيطة في التفاعل، ويمكن أن يستخدم لإزالة المنتج في الموقع، مما يؤدي إلى خفض سمية المذيبات وزيادة الإنتاجية [٢٠].

obeikandl.com

(٣, ٤, ٢, ٨) التقطير الغشائي والتبخير المسبق Membrane Distillation and Pervaporation

تم توسيع إمكانات الأغشية إلى فصل المنتجات المتطايرة عن طريق التقطير الغشائي والتبخير المسبق، على التوالي [٢١، ٢٢]. ويتصل المحلول المغذي في كلٍ من التقنيتين بالجانب الداخل للغشاء، في حين يتم الحصول على المنتج الرشيح في شكل بخار على جانب المصب، والذي يتم بعد ذلك تكثيفه. ومع ذلك، فإن الفرق الأساسي بين الاثنين هو الدور الذي يؤديه الغشاء في الفصل (الشكل رقم ٨, ١١).



الشكل رقم (٨, ١١). فصل المنتجات المتطايرة خلال الأغشية في (أ) التقطير الغشائي و(ب) التبخير المسبق. في التقطير الغشائي يمر بخار المنتجات المتطايرة خلال مسام الغشاء ويتم تكثيفه على جانب الرشيح بعدة طرق مختلفة. في التبخير المسبق تنتشر الجزيئات في السائل المغذي خلال مسام الغشاء ويتم تحويلها إلى بخار على جانب الرشيح عن طريق تطبيق فراغ أو غاز حامل.

يستخدم غشاء التقطير غشاء غير مبلل دقيق المسام يمنع محاليل السائل من دخول مسامه؛ بسبب قوة التوتر السطحي، ويعمل فقط كحاجز للسطح البيني بين السائل والبخار دون المساهمة في أداء الفصل. يحدث الفصل في التقطير الغشائي عندما يمر البخار من المكونات عالية التطاير عبر مسام الغشاء من خلال آلية للحمل الحراري أو للانتشارية ويتكثف على جانب الرشيح للغشاء. وتكون القوة الدافعة للنقل هي فرق ضغط البخار عبر مسام الغشاء، والذي يتم الحفاظ عليه بوسائل مختلفة [٢٢].

وفي التقطير الغشائي ذو الاتصال المباشر يتصل كلاً من جانبي الغشاء بطورٍ سائل، ويستخدم السائل على جانب الرشيح كبيئة التكاثف للأبخرة التي تغادر محلول التغذية الساخن. وفي التقطير الغشائي ذو فجوة الهواء تتواجد فجوة هواء راكدة بين الغشاء وسطح التكثيف في حين في التقطير الغشائي ذي الغاز المكتسح يجتاح غاز خامل بارد جانب الرشيح من الغشاء حاملاً جزيئات البخار التي يتم تكثيفها خارج وحدة الغشاء، وفي التقطير

الغشائي التفريغي يتم استخدام تفريغ على جانب الرشيح والذي يكون أقل من ضغط التشبع للجزيئات المتطايرة التي يتم فصلها من محلول التغذية.

الأغشية الكارهة للماء المستخدمة في التقطير الغشائي هي تلك المستخدمة في الترشيح الدقيق والمصنعة من مواد فلوريدات البولي تيترافلوروإيثيلين (PTFE)، والبولي بروبيلين، والبولي فينيليدين، ولها حجم مسام في حدود ١٠ نانومتر–١ ميكروميتر. وقد استخدم التقطير الغشائي لإزالة المركبات العضوية المتطايرة من المحاليل المائية المخففة وحتى فصل المكونات غير المتطايرة، ومع ذلك فقد كان هناك قبول قليل للتطبيقات كبيرة النطاق بسبب القيود الكثيرة المتعلقة بخصائص الغشاء، والطاقة والتكاليف الاقتصادية.

من الناحية الأخرى، فإن التبخير المسبق يستخدم الأغشية الكثيفة المصنوعة من البوليمرات المتجانسة المنتفخة التي تجعل الأغشية نفاذة. وعلى عكس التقطير الغشائي تنتشر الجزيئات في سائل التغذية عبر الغشاء ويتم ادمصاصها في طور البخار في جانب المصب من الغشاء إما عن طريق خلق تفريغ وإما باستخدام غاز حامل [١٠]. وهكذا يعتمد الفصل على الذوبان النسبي وانتشارية كل مكون في مادة الغشاء مما يسمح بإزالة حتى المذيبات عالية الغليان. ويعطي تدفق الرشيح φ_m في التبخير المسبق على النحو التالي:

$$\phi_m = \frac{DKC}{d_m}\left(1-\frac{p_2}{p_1}\right) \qquad (٨,١٢)$$

حيث K هو ثابت الذوبان، D هو معامل الانتشار، C هو تركيز المكون في الغشاء، d_m هو سمك الغشاء، وp_1 و p_2 هما الضغط الجزئي على الجزء المحتجز والرشيح، على التوالي.

ويظهر التبخير المسبق انتقائية أعلى ولكن تدفقات أقل بكثير من التقطير الغشائي. واعتماداً على المكون المترشح فإن هناك وضعين: (أ) التبخير المسبق المحب للماء والذي يتم فيه فصل المياه من المخاليط المائية العضوية عن طريق ترشيحها بصورةٍ تفضيلية خلال غشاء محب للماء (على سبيل المثال كحول البولي فينيل) و(ب) التبخير المسبق المحب للمواد العضوية والذي يتم فيه ترشيح المركبات العضوية المستهدفة بصورةٍ تفضيلية من المخاليط المائية العضوية باستخدام أغشية محبة للمواد العضوية (على سبيل المثال، النيتريل، ومطاط البيوتاديين، والبولي داي ميثيل زيلوكسان).

وقد كان تطوير التبخير المسبق أيضاً بطيئاً نوعاً ما؛ نظراً لارتفاع استهلاك الطاقة، وانخفاض التدفق، وعدم كفاية الانتقائية، وصعوبة تصميم العملية. ومع ذلك، فقد كان هناك قدر كبير من الاهتمام على مدى السنوات في تطبيق التبخير المسبق للإزالة الانتقائية للمذيبات خلال التخمير وكذلك لتركيزها، وقد بذلت الجهود لصناعة أغشية ذات انتقائية محسنة. وهناك أيضاً اهتمام متزايد في تكامل التبخير المسبق مع التفاعلات الحفزية الحيوية لإزالة

المنتج في الموقع للمنتجات المثبطة [٢٣].ويتحقق فصل المخاليط الازوتروبيه بشكلٍ فعال عن طريق كلٍ من التقطير الغشائي والتبخير المسبق.

(٨, ٢, ٥) الفصل اعتماداً على ذوبان المنتج Separations Based on Product Solubility

تستخدم تقنيات الفصل التي تستخدم فرق ذوبان الجزيئات في طورين غير قابلين للامتزاج (أي الاستخلاص) أو نقص الذوبان تحت ظروف بيئية معينة (أي الترسيب أو التبلور) بصورةٍ شائعة لتركيز وتنقية المنتج. والميزة الرئيسة لهذه التقنيات هي بساطة التشغيل ولكنها تتطلب إضافة كواشف مساعدة والتي تحتاج إلى إعادة تدويرها.

(٨, ٢, ٥, ١) الاستخلاص Extraction

استخلاص السائل من السائل يعدُّ واحداً من أكثر وحدات التشغيل المتقدمة والمستخدمة على نطاقٍ واسع في الصناعات الكيميائية والتقنية الحيوية، بعد أن وجدت تطبيقات في تركيز وتنقية مجموعة متنوعة من المنتجات مثل الأستيرويدات، والمضادات الحيوية، والأحماض العضوية. ولاسترداد المنتجات الحيوية فإن الاستخلاص يتطلب معالجة الطور المائي (الذي يحتوي على المذاب) بمذيبٍ عضوي غير قابل للامتزاج، وبذلك سوف يوزع المذاب نفسه بين الطورين اعتماداً على الاختلاف في ذوبانه في السائلين [٧، ١٠].

وتسمى نسبة التركيز في الطورين بمعامل التوزيع ويعطي عن طريق $\alpha = Y_L/X_H$، حيث Y_L وX_H هي تركيزات المذاب في الطور الخفيف والطور الثقيل، على التوالي. ويمكن أن يتأثر معامل التوزيع بمذيب الاستخلاص (طبيعة التفاعل مع الماء)، وقيمة الأس الهيدروجيني (خاصةً للأحماض والقواعد الضعيفة)، ودرجة الحرارة، والأملاح (الأيونات العكسية للمواد المذابة الأيونية)، والمضافات الأخرى (المعدلات)، وإلى حدٍ صغير الضغط الخارجي على النظام.

على افتراض أن α ثابت وتدفق الكتلة للأطوار القابلة للامتزاج يكون محفوظاً، فإن توازن الكتلة على المذاب المستخلص يكون:

$$H(X_0 - X_1) = LY_1 \quad \text{or} \quad X_1 = X_0 - \frac{L}{H}Y_1 \tag{٨, ١٣}$$

باستبدال K_D في المعادلة السابقة،

$$X_1 = X_0 - \frac{L\alpha}{H}X_1 \tag{٨, ١٤}$$

$$\frac{X_1}{X_0} = \frac{1}{1+(L\alpha/H)} = \frac{1}{1+E} \qquad (٨,١٥)$$

حيث E = Lα/H هو عامل الاستخلاص لمذاب في نظام محدد.

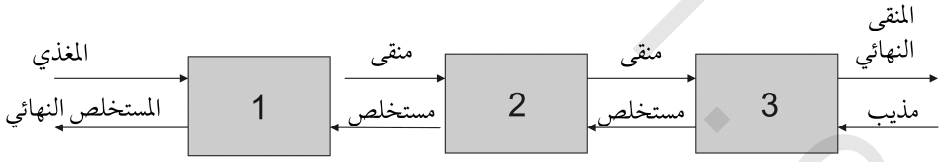
ويستخدم الاستخلاص متعدد المراحل في كثيرٍ من الأحيان لتحقيق كفاءة العملية القصوى، والذي يتم عادةً على النطاق الواسع في وضع معاكس (الشكل رقم ٨,١٢) باستخدام معدات مثل مستخلص بودبيلنياك للطرد المركزي، أو قواطع دلافال، أو جهاز فيستيفاليا للطرد المركزي الساكب. ولاستمرار التشغيل المعاكس، فإن المادة المتوازنة على المذاب المستخلص تنتج:

$$R = \frac{E(E^n - 1)}{E - 1} \qquad (٨,١٦)$$

حيث R هي نسبة الرفض (أي نسبة وزن المذاب المغادر في الطور الخفيف إلى ذلك في المرحلة الثقيلة) و n هو عدد مراحل التوازن. ويصبح جزء المذاب المستخلص:

$$\%\ \text{extraction} = 1 - \frac{1}{R+1} \qquad (٨,١٧)$$

وفي حالة الاستخلاص من مخلوط خام، فمن الأفضل إزالة الخلايا أو الجسيمات الأخرى لتجنب تشكيل المستحلبات في السطح البيني. وبعد الاستخلاص تتم إزالة المنتج من المذيبات إما عن طريق التقطير (للمنتج في حالة المذيبات عالية الغليان أو المذيبات ذات نقطة الغليان المنخفضة)، وإما عن طريق الاستخلاص العكسي إلى المرحلة المائية.



الشكل رقم (٨,١٢). الوضع المعاكس متعدد المراحل لاستخلاص السائل من السائل.

وقد يكون من السهل نسبياً استخلاص المواد المذابة المحبة للدهون؛ بسبب تفضيلها للتوزيع في الطور العضوي. ولكن في حالة استخلاص الجزيئات الأقل كرهاً للماء فإنه غالباً ما تؤخذ عوامل أخرى في الاعتبار. بالنسبة للمواد المذابة المشحونة فمن الممكن استغلال ثوابت تفككها لتحقيق فصل فعال، أي أنه يمكن عمل الفصل تحت قيمة الـ pK_a للأحماض وأعلى من قيمة الـ pK_a للقلويات عندما تكون في الغالب في صورةٍ غير متأينة كما هو مبين:

$$\text{pH-p}K_a = \log_{10}\left[\frac{\alpha^0}{\alpha} - 1\right] \text{ for acids} \quad (٨,١٨)$$

$$\text{p}K_a\text{-pH} = \log_{10}\left[\frac{\alpha^0}{\alpha} - 1\right] \text{ for bases} \quad (٨,١٩)$$

حيث α^0 هو معامل التوزيع الحقيقي، أي نسبة تركيز المذاب غير المتأين في الطور العضوي والمائي، على التوالي، وα هي معامل التوزيع الفعال، مع الأخذ في الاعتبار المكون المتأين للمذاب في الطور المائي. ويمكن استخدام الاختلافات في قيمة الـ pK_a للمكونات القابلة للتأين للتغلب على النسبة السلبية لمعاملات التوزيع وتحقيق لفصلها من خليط.

والاستخلاص التفاعلي هو طريقة أخرى لتسهيل الاستخلاص، والذي يعتمد على تفاعل عكسي بين الحمض والمستخلص (الناقل) مثل الأمينات الأليفاتية أو مركب فسفوري المضافة إلى المذيب [٢٤]. ويكون المتراكب المتكون أيضاً غير قابل للذوبان في الطور المائي، وعليه يتم حمل المذاب إلى الطور العضوي. ويجري تطبيق هذه الطريقة في استخلاص الأحماض العضوية.

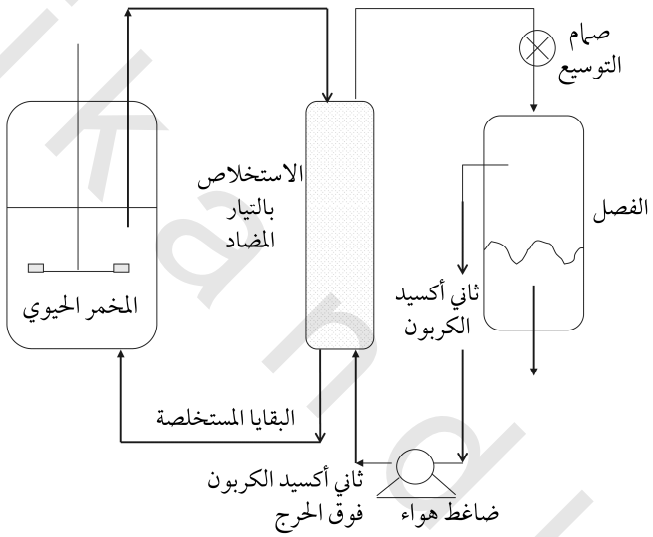
غالباً ما يكون الاستخلاص هو الأسلوب المفضل عندما يمكن تطبيقه لاسترداد المنتج؛ ومع ذلك تحتاج بعض العيوب مثل استرداد المذيبات المكلفة، والشواغل البيئية، وجوانب السلامة إلى النظر فيها. وعلاوةً على ذلك، تحد مشكلات تكوين المستحلب والسمية للخلايا من استخدام الاستخلاص بالمذيبات كتقنية لإزالة المنتج في الموقع.

ويتم تجنب الاتصال المباشر للمذيب بالخلايا عن طريق دمج الاستخلاص بالمذيبات مع التنفيذ الغشائي في تقنية تسمى الاستخلاص التنفيذي. ويمكن نقل الجزيئات التي تنقسم إلى السائل حاشيةً مسام الغشاء باستخدام الغشاء بوصفها حاجزاً مائياً بين محلول مائي مغذي ومذيب عضوي. على سبيل المثال، تستخدم الأغشية الكارهة للماء، والتي لها مسام مملوءة بالطور العضوي، لاستخلاص المنتجات غير القطبية من البيئة المائية.

استخلاص السوائل فوق الحرجة أدت العيوب المرتبطة بالاستخلاص بالمذيبات إلى اهتمامٍ متزايد في تطوير استخلاص السوائل فوق الحرجة (SFE) كتقنية استخلاص بديلة. والسوائل فوق الحرجة (SCFs) هي مواد تتواجد كسوائل فوق درجة حرارتها الحرجة وضغطها الحرج. ويكون الكثير من خصائص الـ SCFs (على سبيل المثال، الانتشارية، واللزوجة الحركية، والكثافة) متوسطة بين تلك في حالة الغازات والسوائل، والتي توفر ظروف أفضل للاستخلاص مثل نقل الكتلة أسرع مما هو عليه في السوائل [٢٥]. وعلاوةً على ذلك، تكون خصائص المذيبات من الـ SCFs شديدة الحساسية للتغيرات في كلٍ من درجة الحرارة والضغط، ويستخدم مذيب تعاوني (على سبيل المثال، الإيثانول)، والذي يوفر الفرصة لتصميم قوة المذيب لتطبيق معين. والـ SCF المستخدم في الاستخلاص

الحيوي هو ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج؛ بسبب درجة حرارته الحرجة المنخفضة نسبياً (٣١,٣ درجة) والضغط (٧٢,٩ بار). وهناك حالياً اهتمام كبير في استخدام ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج كمذيب "أخضر" خلال التحويلات الإنزيمية للمواد الكارهة للماء.

وفي عملية استخلاص نموذجية مستخدمة لاسترداد المنتج يتم استخلاص المواد الخام بثاني أكسيد الكربون فوق الحرج المضغوط في عمود استخلاص. ثم يتم نقل الـ SCF المحمل إلى جهاز فصل حيث يتم خفض الضغط بحيث يتحول السائل إلى غاز، محرراً المنتج كراسب. ويتم ضغط الغاز وإعادة تدويره إلى عمود الاستخلاص (الشكل رقم ١٣,٨).



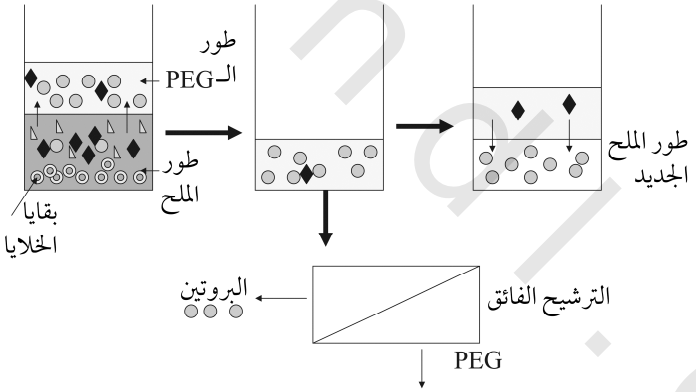
الشكل رقم (١٣,٨). مخطط لاستخدام استخلاص السوائل فوق الحرجة في عمليات التجهيز النهائي في التقنية الحيوية الصناعية. يتم استرداد المنتج المستخلص إلى ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج بعد خفض الضغط والغاز ويتم إعادة ضغط غاز ثاني أكسيد الكربون وإعادة تدويره [١٠].

وتجعل ضرورة وجود معدات عالية الضغط استخلاص السوائل فوق الحرجة أكثر تكلفة من الاستخلاص بالمذيبات. وعلى الرغم من هذا، فإنه تتواجد بعض التطبيقات المجدية اقتصادياً على المستوى الكبير (على سبيل المثال، استخلاص الزيوت والقهوة). وإلى جانب الاستخلاص المباشر للمحلول المغذي يمكن استخدام الـ SCF لإزالة بقايا المذيبات من المنتج المسترد عن طريق الاستخلاص بالمذيبات.

الاستخلاص المائي ثنائي الطور (ATPS) عندما يقتصر الاستخلاص بالمذيبات والسوائل فوق الحرجة على استرداد الجزيئات العضوية الصغيرة، فإنه يتم استخلاص البروتينات باستخدام النظم المائية ثنائية الطور على

النحو المذكور سابقاً في القسم (٨,٢,١) [١٤]. ويكون أساس الفصل في الـ ATPS هو التوزيع الانتقائي بين الطورين. وبينما تتوزع الجزيئات الصغيرة بصورة أكثر أو أقل تساوياً بين الطورين، يكون توزيع الجزيئات الكبيرة متغيراً للغاية. ويخضع هذا التوزيع إلى عددٍ من العوامل المتعلقة بخصائص الأطوار والمذاب وكذلك التفاعلات بين الاثنين. ويمكن جعل التقسيم أكثر انتقائية، على سبيل المثال عن طريق التلاعب في خصائص النظام لجعل نوع تفاعل معين سائداً.

يكون الـ ATPS سهل الاستخدام ويمكن أن يؤدي إلى تكامل الترويق، والتركيز، والتنقية للبروتينات في عملية تشغيل واحدة. ويتم استرداد بعض الإنزيمات على المستوى الصناعي عن طريق الـ ATPS. ويشيع استخدام النظم المصنوعة من البولي إيثيلين جليكول (PEG) والملح بسبب تكلفتها المنخفضة. ويتم اختيار ظروف الاستخلاص بحيث يتوزع البروتين المستهدف إلى الطور الأعلى الغني بالـ PEG بينما تتوزع جسيمات الخلايا وغالبية الملوثات الذائبة في الطور الأسفل (الشكل رقم ٨,١٣). ويتم فصل الطور بعد خلط مكونات الطور مع متجانسات الخلايا، ويتم استرداد البروتين من الطور الأعلى إما عن طريق خطوة تقسيم ثانية إلى طورٍ ملحي جديد وإما عن طريق الترشيح الفائق كما هو مبين في الشكل رقم (٨,١٤).



الشكل رقم (٨,١٤). استخلاص البروتينات في نظام مائي ثنائي الطور مصنوع من البولي ايثيلين جليكول (PEG) والملح. ويتم توزان متجانس الخلايا الذي يحتوي على البروتين المهم مع مكونات الطور في ظل ظروف تسمح للبروتين بأن يتوزع إلى الطور الأعلى الغني بالـ PEG. ويتم فصل الأطوار واسترداد المنتج من طور الـ PEG إما عن طريق الترشيح الفائق لإزالة البوليمر وإما بواسطة خطوة توزيع ثانية بحيث يتوزع البروتين إلى طور الملح والذي يمكن فصله منها بسهولة.

الفصل اللوني المعاكس يمكن لاستخلاص السائل من السائل أن يوفر فصل عالي الجودة للمواد المذابة عند إجرائه في وضع الفصل اللوني المعاكس. يمكن أن يكون الطورين السائلين غير القابلين للامتزاج مائي–عضوي،

أو عضوي–عضوي، أو مائي–مائي. ويتم استخدام طور مائي واحد كطورٍ ثابت والذي يتصل به الطور المتحرك في أوضاع مختلفة. ويوظف الوضع الأكثر تطوراً للفصل اللوني المعاكس حركة كوكبية لأنبوب حلزوني موجود حول طبلة في مجال طرد مركزي والذي يوفر مناطق متبادلة لخلط الأطوار وفصل السائلين غير القابلين للامتزاج في الملف [٢٦]. ويتم الاحتفاظ بالطور الثابت الثقيل في الملف بينما يتم ضخ الطور المتحرك الخفيف خلاله. ويتم إدخال المواد المذابة المراد فصلها إلى الملف مع الطور المتحرك وتتعرض لتوزيع متعدد المراحل. ويمكن تبني هذه التقنية لتطبيقات إزالة المنتج في الموقع، حيث يكون استخدام المذيبات التي توفر الاستخلاص الانتقائي مرغوباً فيه [٤]. وعند استخدام تقنية إزالة المنتج في الموقع، فإنه يمكن أيضاً تقييد الإنزيمات أو الخلايا الكاملة في الطور الثابت للملف في حين يتم توزيع المنتج بصورةٍ تفضيلية في الطور المتحرك.

(٨,٢,٥,٢) الترسيب والبلورة Precipitation and Crystallization

يعتمد الترسيب والبلورة على الانتقال من الطور السائل إلى الصلب تحت ظروف فيزيائية كيميائية محددة.

الترسيب يشيع استخدامه في عمليات التجهيز النهائي للبروتينات لتركيز المنتج، ويمكن أيضاً استخدامه لتحقيق درجة معينة من التنقية. وتشمل مزاياه القدرة على التكيف مع التجهيز المستمر والنطاقات الأكبر، والتشكيلة الواسعة من المرسبات الممكنة، والقدرة على الاحتفاظ بالنشاط الحيوي. وعلى الرغم من أن هناك وسائل عديدة لترسيب البروتينات، فإن الإزالة بالملح هي الأكثر شيوعاً باستخدام تركيزات عالية من كبريتات الأمونيوم أو كبريتات الصوديوم، والترسيب عن طريق إضافة المذيبات (مثل الإيثانول أو الأسيتون) عند درجة حرارة منخفضة.

في الإزالة بالملح، تتفاعل أيونات الملح المضاف مع الماء بقوةٍ أكبر، مما يسبب ترسيب البروتين بسبب زيادة التفاعلات الكارهة للماء. وتعطي قابلية ذوبان البروتينات كدالة لقوة المحلول الأيونية بواسطة:

$$\log\frac{S}{S_0} = -K_s(\mathrm{I}) \qquad (٨,٢٠)$$

حيث S هو ذوبان البروتين في المحلول عند قوة أيونية I، S_o هو الذوبان عند قيمة قوة أيونية صفر، و K_s هو ثابت الإزالة بالملح، والذي هو دالة لدرجة الحرارة ودرجة الحموضة. وتساوي القوة الأيونية للمحلول

$$\mathrm{I} = \frac{1}{2}\sum C_i Z_i^2 \qquad (٨,٢١)$$

حيث C_i وZ_i هما التركيز المولي والشحنة لأنواع الأيونات، على التوالي.

ويحدث ترسيب البروتينات عند إضافة المذيبات العضوية بسبب تقليل ثابت العزل الكهربائي للمحلول وفقاً لـ:

$$\log\frac{S}{S_0} = -\frac{K'}{D_\varepsilon^2} \qquad (٨,٢٢)$$

حيث D_ε هو ثابت العزل الكهربائي للمحلول ويعتمد الثابت 'K على درجة الحرارة والبروتين المستخدم. ويسهل خفض ثابت العزل الكهربائي من الترسيب بسبب زيادة التفاعلات الكهربائية بين جزيئات البروتين.

ويمكن أيضاً تطبيق الترسيب لإزالة الحمض النووي خلال تنقية منتج حيوي من الخلايا الميكروبية. ومن بين المنتجات الحيوية منخفضة الوزن الجزيئي، فإنه يتم ترسيب الأحماض العضوية كأملاح للكالسيوم. ويمكن أيضاً عزل الأحماض العضوية كمتراكبات شحيحة الذوبان، على سبيل المثال، يتم استرداد السيفالكسين عن طريق التراكب مع البيتا-نافثول وتكون الطريقة مناسبة لإزالة المنتج في الموقع [٢٧]. وأياً ما كان اختيار تقنية الترسيب، فإن المرء يحتاج للنظر في تأثيرها على عمليات التجهيز النهائية اللاحقة وأيضاً معاملة النفايات المتولدة.

التبلور هو واحد من أكثر وسائل التنقية القوية المتاحة وعادةً ما يستخدم كخطوة نهائية لصقل وصياغة المنتجات الكيميائية من محلول يحتوي على مجموعة متجانسة من جزيئات المنتج. وحتى في حالة المنتجات البروتينية، فإنه يتم الآن توسيع مفهوم التبلور الذي كان مقصوراً في السابق على تحديد تركيبها ثلاثي الأبعاد، وذلك من أجل تطبيقه كتقنية تجهيز نهائية للاسترداد مباشرةً من المحاليل غير النقية نسبياً وحتى من محلول التخمير [٢٨]. وتجعل إمكانية استبدال الأساليب المنافسة مثل الفصل اللوني بتقنية بسيطة نسبياً وغير مكلفة، البلورة تقنية جذابة، مع المزايا الإضافية من حيث الصياغة والتخزين. وقد تبين أن إزالة المنتج في الموقع من المخمر تكون ممكنة عن طريق دائرة بلورة خارجية [٢٩].

ويكون التشبع الفائق هو القوة الدافعة للتبلور، والتحكم في التشبع الفائق هو الجانب الحاسم للعملية. وغالباً ما يكون تبخر المذيبات غير مرغوب فيه؛ بسبب الثبات الحراري المحدود للمنتجات، وعليه فقد أجريت محاولات لاستخدام طرق بديلة لإزالة المياه. في نزح المياه التناضحي، يتم نقل المذيبات عبر أغشية انتقائية للمذيبات تحت ضغط. وتعتمد البلورة الاستخلاصية على ميل بعض مخلوطات المذيبات المائية للتقسيم إلى طورين سائلين عند التغيرات الصغيرة في درجة الحرارة بحيث يصبح المذاب المائي أكثر تركيزاً في حجم أصغر ويتبلور في نهاية المطاف، في حين تتم إعادة تدوير المذيب النقي.

يستخدم التبلور التجزيئي لفصل مخلوطات متعددة المكونات، على سبيل المثال الأحماض العضوية، والمونومرات، والمصاوغات، وما إلى ذلك، إلى أجزاء ضيقة، مما يؤدي في النهاية إلى درجات نقاء عالية للمكونات

المختارة. وتشمل طريقة الغشاء الهابط للتبلور التجزيئي (شركة سولزر كيمتيك، سويسرا) نمو البلورات على سطح يتم تبريده خارجياً بواسطة غشاء هابط لمبرد في الوقت نفسه. ويحفز تسخين جدار الأنبوب الذوبان الجزئي (التعرق) للبلورات ويتم تصريف المواد المنصهرة. وفي نهاية المطاف يتم إذابة طبقة البلورات المتبقية وجمعها كمنتج، في حين يتم إعادة تدوير جزء العرق من أجل البلورة. وعلى نحو مماثل، يمكن تعريض الرواسب المصروفة في الطور الأول لنفس الطريقة لتعطي عوائد أفضل.

تبلور المتصاوغات الفراغية هو الأسلوب السائد المستخدم في تحليل المخاليط الراسمية، والذي يقوم على أساس ربط عامل محلل إلى نظائر ضوئية ليعطي زوج من أملاح المصاوغات الفراغية والتي يمكن فصلها بسهولة بسبب الاختلاف في الذوبان [٣٠]. على سبيل المثال، يشيع استخدام إل-ليسين كعامل محلل لفصل النظائر الضوئية للإيبوبروفين؛ وملح دي-إيبوبروفين-إل-ليسينات له قابلية للذوبان أقل بكثيرٍ من ملح النظير الضوئي إل- وعليه يمكن فصله بسهولة [٣١]. وفي معظم الحالات، يتم استرداد العامل المحلل بعد فصل النظير الضوئي المطلوب من ملح المصاوغات الفراغية ويصبح متاحاً لإعادة استخدامه. وإذا تم إعادة راسمية النظير الضوئي المتبقي غير المرغوب فيه، فإنه يمكن استرداد مادة مطلوبة أكثر من المخلوط. ويمكن أيضاً استخدام تبلور المصاوغات الفراغية للحصول على نقاوة أعلى (على سبيل المثال، بعد التحليل الإنزيمي للراسيميات).

(٦, ٢, ٨) فصل الجزيئات اعتماداً على الادمصاص على مصفوفة صلبة

Molecular Separations Based on Adsorption to a Solid Matrix

إن ادمصاص المواد المذابة في الماء على مواد ماصة صلبة بواسطة آليات مختلفة هو وسيلة شائعة لفصلها عن سائل التغذية، وتوفر طريقة مفيدة لتركيز وتنقية المنتجات. في الادمصاص الفيزيائي، تهيمن القوى الضعيفة مثل قوى فان دير فال، في حين يستعمل ادمصاص التبادل الأيوني روابط أيونية قوية. والكربون المنشط هو مادة ماصة تستخدم في كثيرٍ من الأحيان لإزالة اللون من محاليل التخمير. وتستخدم راتنجات التبادل الأيوني وغيرها من الممتزات البوليمرية لفصل المواد العضوية الصغيرة، على سبيل المثال المضادات الحيوية، والأحماض الأمينية وغيرها، وأيضاً الجزيئات الكبيرة. وتعتمد قدرة الامتزاز على طبيعة الممتزات والمذاب، والظروف الفيزيائية الكيميائية المستخدمة.

وتستند عملية الامتزاز، مثل الاستخلاص على علاقة توازن بين تركيز المذاب في الطور السائل والطور المساعد (الصلب)، والتي تحدد إلى أي مدى يمكن للمذاب أن يدمص على سطح. وقد تم وصف علاقات التوازن عن طريق عدة أنواع من الامتزاز الأيزوثيرمي. ويستخدم أيزوثيرم فرويندليش على نطاقٍ واسع في النظم الصلبة- السائلة:

$$C_S^* = K_F C_L^{*(1/n)} \quad (٨,٢٣)$$

حيث C_L^* وC_S^* هي تركيزات التوازن من المذاب في الطور السائل والصلب، على التوالي؛ K_F و n هي ثوابت مميزة لنظام ادمصاص معين؛ وتعتمد أبعاد K_F على أبعاد C_S^* وC_L^* وقيمة n والتي تكون أكبر من ١ إذا كان الامتزاز ملائماً و أقل من ١ إذا كان الامتزاز غير مواتياً.

يستند أيزوثرم لانجمويز على امتزاز الجزيئات كطبقة أحادية وكثيراً ما يستخدم لتحديد ادمصاصات البروتين:

$$C_S^* = \frac{C_{Sm} K_L C_L^*}{1 + K_L C_L^*} \quad (٨,٢٤)$$

حيث C_{Sm} هي الحد الأقصى لتحميل المذاب على الممتزات. K_L هو ثابت توازن لانجمويز الذي يعتمد على شدة قوي الربط على السطح؛ وقيمته دائماً أكبر من الصفر. وفي حالة البروتينات تعتمد K_L على نقطة التعادل الكهربية للبروتين، ودرجة الحموضة، والقوة الأيونية للمحلول.

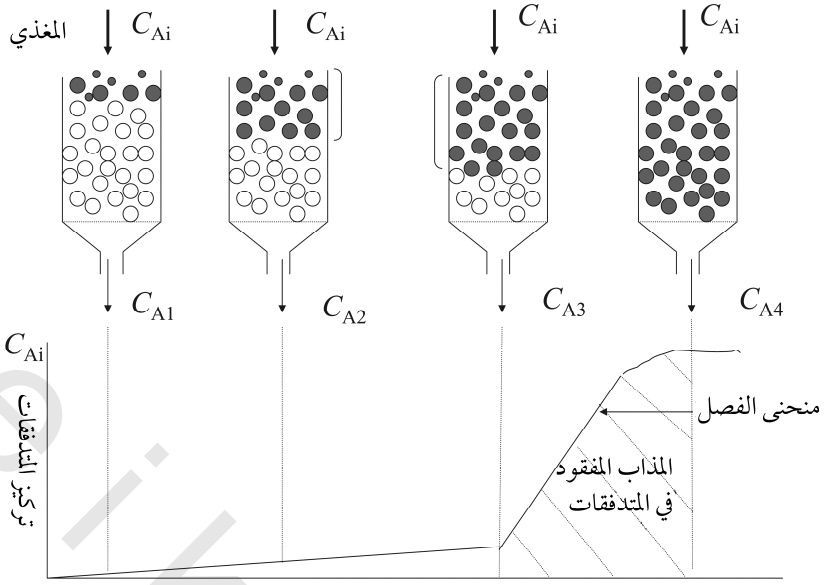
وغالباً ما تستخدم ممتزات الجسيمات في أنواعٍ مختلفة من الموصلات الصلبة–السائلة مثل الوسادة المعبأة، والوسادة المتحركة، والوسادة المتخللة أو مقاومات الوعاء ذو التقليب. ومقاومات الوسادة المعبأة والمتحركة هي الأكثر استخداماً؛ لأنها توفر أكبر مساحة امتزاز لكل وحدة حجم. ويوضح الشكل رقم (٨,١٥). تشغيل ممتز الوسادة المعباءة سفلي التدفق. وقد تم اشتقاق الأغشية الدقيقة/ الفائقة بمجموعات نشطة لتسهيل ادمصاص المواد المذابة مباشرةً من المحلول الخام؛ وهذه يمكن إزالتها واستردادها في وقتٍ لاحق في الرشيح [١١].

ويعتمد تحليل الامتزاز في عمود الوسادة المعبأة على فرق توزان الكتلة في تدفقات المدخلات والمخرجات. ويحدث إدخال وإزالة المواد المذابة من جزء محدد في وسادة معبأة بشكلٍ رئيس بواسطة تدفق السائل إلى أسفل العمود، بينما يمكن ربط آليات أخرى لعمليات المزج الموضعي والانتشار داخل الفجوات بين جسيمات الممتزات. وسوف يحدث تراكم للمواد المذابة؛ بسبب الادمصاص إلى السطح الداخلي والخارجي للممتزات، وحتى في الفجوات بين جسيمات الممتزات. ويمكن تبسيط التحليل من خلال عدم أخذ آثار التشتت المحوري في الاعتبار لإعطاء:

$$U\frac{\partial C_L}{\partial z} + \varepsilon\frac{\partial C_L}{\partial t} = -(1-\varepsilon)\frac{\partial C_S}{\partial t} \quad (٨,٢٥)$$

حيث U هي سرعة السائل السطحية، C_L هو تركيز المذاب في السائل، C_S هو متوسط تركيز المذاب في الطور الصلب، Z هو عمق الوسادة، t هو الزمن، وε هو الجزء الفارغ في الوسادة. ويمثل الشق الأول في المعادلة نقل الحمل الحراري للمذاب في الوسادة، الشق الثاني هو معدل تغيير تركيز المذاب في السائل حول جزيئات الممتز، والشق الأخير هو معدل نقل المذاب من الطور السائل إلى الطور الصلب.

obeikandl.com



الشكل رقم (٨,١٥). انتقال منطقة الادمصاص في ممتز وسادة معبأة ومنحني الانفراج المقابل. يتم إدخال المحلول المغذي الذي يحتوي على المذاب بتركيز C_{Ai} في الجزء العلوي من عمود محمل بالممتز والذي يحمل المذاب، والمحلول الخارج من العمود يكون منخفض التركيز من المذاب. عندما يتحرك السائل إلى أسفل العمود تتحرك منطقة وسادة الممتز حيث يحدث معظم الادمصاص، وتتحرك منطقة الادمصاص إلى أسفل العمود وتصل في النهاية إلى أسفل الوسادة. وعندما يتشبع العمود تقريباً يبدأ تركيز المذاب في المحلول المتدفق في الارتفاع (نقطة التوقف) ويصل لمستوى تركيز الداخل. مأخوذة بإذن من دوران [٩]، الصحافة الأكاديمية.

وإذا كان محتوى السائل حول الجزيئات صغيراً مقارنةً مع إجمالي حجم الوسادة، فيمكن أيضاً إلغاء الشق الثاني. وعند استبدال $\delta C_s/\delta_t = K_a(C_L-C_L^*)$ (حيث K_a هو معامل نقل الكتلة الكلي الذي يصف نقل مقاومة الكتل الداخلية والخارجية)، فيمكن تبسيط المعادلة أكثر إلى:

$$U\frac{\partial C_L}{\partial z} = -K_a(1-\varepsilon)(C_L - C_L^*) \qquad (٨,٢٦)$$

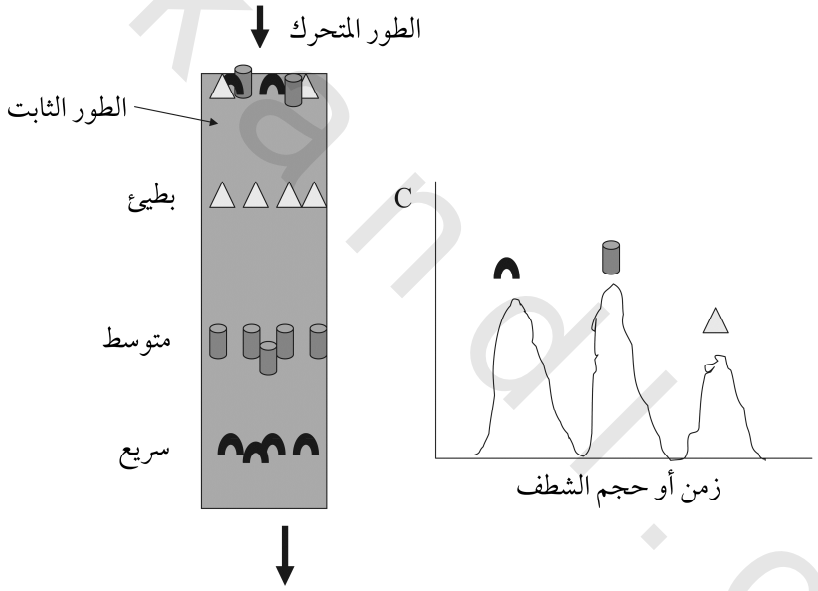
وسوف تعتمد قيمة K على خصائص السائل وظروف التدفق. وتسلط المعادلة سابقاً الضوء على أهمية نقل الكتلة في نظم الادمصاص. ونادراً ما يتحقق التوازن في نظم الادمصاص التجارية، حيث يتم التحكم في الأداء بواسطة معدل الادمصاص العام. ويمكن تحقيق تحسينات في الادمصاص عن طريق تقليل مقاومة نقل الكتلة.

وبعد الادمصاص من محلول التغذية يأتي غسيل المواد الماصة لإزالة المواد المذابة المرتبطة بطريقة بسيطة قبل إزالة المنتج المراد. وبعد ذلك تتم إعادة تدوير المواد الماصة بعد تجديدها.

obeikandl.com

(٨,٢,٦,١) الفصل اللوني الادمصاصي Adsorption Chromatography

يشكل الفصل اللوني على وسادة جسيمات ممتزة تقنية عالية الدقة لفصل المواد المذابة ويستخدم على نطاقٍ واسع من مستوى المختبرات إلى الصناعة لتنقية معظم المنتجات عالية القيمة للتقنية الحيوية [٧، ١٨]. وهو يستخدم فرق امتزاز الجزيئات على سطح مصفوفة مشتقة لتحتوي على مجموعات وظيفية مرتبطة تساهمياً (الشكل رقم ٨,١٦). ويمكن إزالة المواد المذابة المرتبطة بالمصفوفة بدرجات انجذاب مختلفة باستخدام مزيل مناسب. وكلما تحركت المواد المذابة إلى أسفل العمود مع تيار المزيل، فإنها تواصل الادمصاص من المصفوفة؛ وسوف تكون الكيانات ضعيفة الارتباط أكثر سهولة في إزالتها وتتحرك إلى الأمام بسرعة أكبر. وعليه ، فإن كل مكون مفصول بواسطة الفصل اللوني لديه حجم إزالة مختلف V_e (أي حجم المزيل المطلوب ليحمل المذاب خلال العمود حتى يخرج في تركيزه الأقصى).



الشكل رقم (٨,١٦). مبدأ الفصل اللوني السائل. تتم إزالة المواد المذابة المرتبطة بدرجات مختلفة إلى الطور الثابت في أوقات أو أحجام إزالة مختلفة من العمود، عن طريق تغيير تكوين الطور المتحرك بطريقة متدرجة أو مستمرة.

من الناحية المثالية فإنه ينبغي أن تخرج المواد المذابة من العمود في نطاقات إزالة ضيقة عند أزمنة مختلفة ومفصولة جيداً عن بعضها البعض. ومع ذلك، ففي الممارسة العملية تنتشر نطاقات الإزالة؛ بسبب آثار الانتشار التي قد يتعرض لها المذاب في العمود. ويتم تحليل ما يسمى بانتشار المنطقة في الفصل اللوني باستخدام مفهوم اللوحات النظرية. ويتم اعتبار العمود اللوني متكوناً من عدد من القطاعات أو اللوحات ذات طول H، ومقدارها

من نفس مقدار قطر جزيئات الممتز والتي يفترض أن يحدث التوازن خلالها. كلما انخفض ارتفاع اللوحة أو تساوى مع اللوحة النظرية (HETP) ضاقت قمة المذاب. ويتم التعبير عن الـ HETP عن طريق:

$$H = \frac{A}{u} + Bu + C \qquad (٨,٢٧)$$

حيث u هي سرعة السائل الخطية، A، B، C هي تأثيرات نقل الكتلة السائلة–الصلبة، أمام وخلف التشتت المحوري، والتوزيع غير المثالي للسائل حول التعبئة، على التوالي. ويؤدي خفض قيم A، B، C إلى انخفاض في الـ HETP.

ويرتبط الـ HETP لمذاب خاص بحجم إزالته وعرض قمة الإزالة كما يظهر على الكروماتوجرام. وبافتراض أن قمم الإزالة تكون متناظرة، فإنه يمكن حساب عدد اللوحات النظرية N كما يلي:

$$N = 16\left(\frac{V_e}{w}\right)^2 \qquad (٨,٢٨)$$

w هي عرض قاعدة القمة. وتنطبق المعادلة أعلاه عندما يتم إدخال العينة كنبضة ضيقة. ويتم تعيين طول العمود L بواسطة N و HETP وفقاً لما يلي:

$$N = \frac{L}{H} \qquad (٨,٢٩)$$

وعليه، فإنه بالنسبة لعمود معين فكلما زادت N زاد عدد مراحل التوازن وكان الفصل أكثر كفاءة. وفي حالة القمم الواسعة، فيمكن أن يحدث التداخل حتى عند عدد اللوحات العالي. وتحدد قدرة العمود على فصل القمم (أي التحليل R) كذلك أداء عمود الفصل اللوني:

$$R = \frac{2(V_{e1} - V_{e2})}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} = \frac{\Delta t_r}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \qquad (٨,٣٠)$$

حيث V_{e1} و V_{e2} هي أحجام الإزالة، w_1 و w_2 هي عرض القمم عند القاعدة، وσ_1 وσ_2 هي الانحرافات المعيارية للمكونات ١ و٢، على التوالي؛ Δt_r هي المسافة بين أعلى القمتين الممثلتين بكلٍ من V_{e1} و V_{e2}. ينبغي أن تكون R أكبر من ١ لتوفير فصل جيد للمكونات.

ويمكن أن تتم إزالة المواد المذابة المرتبطة باستخدام الطور المتحرك في وضع أيزوقراطي (يكون تركيب الطور المتحرك ثابتاً خلال الفصل) أو غير أيزوقراطي (يتغير تركيب الطور المتحرك). ويستخدم وضع بديل للإزالة في الفصل اللوني الإزاحي، حيث يتم إدخال مزيح، وهو مادة ذات انجذاب عالي للغاية بالنسبة للطور الثابت، إلى العمود والتي تتنافس على مواقع الادمصاص وتزيح المكونات المرتبطة من العمود.

obeikandl.com

يتم تكوين الأطوار الثابتة المستخدمة في الفصل اللوني للمنتجات الحيوية من كلٍ من المواد غير العضوية (مثل السيليكا) والعضوية (البوليمر الاصطناعي والطبيعي). ومن أجل الحصول على مساحة سطح عالية، فإنه يتم استخدام المصفوفات المسامية ذات متوسط حجم مسام ١٠٠–٣٠٠ ميكروميتر. ويتم نقل الكتلة داخل مسام الجسيمات أساساً عن طريق الانتشار. من الناحية الأخرى، يحدث نقل الكتلة عن طريق الحمل الحراري بدلاً من الانتشار في نظم الطور الثابت اعتماداً على صور الغشاء. وتتيح حركية الادمصاص السريعة وانخفاض الضغط مرة أخرى باستخدام معدلات مرتفعة وسهولة زيادة المستوى في الفصل اللوني بغشاء الادمصاص. وتستخدم حالياً أطوار ثابتة جديدة وهي الدعامات المتجانسة، والتي يتم صبها كأطوار متجانسة متصلة بدلاً من الجزيئات الفردية المعبأة في عمود [٣٢، ٣٣]. ويمكن استخدام الدعامات المتجانسة لتحقيق الفصل الكفء عند معدلات التدفق العالية.

ويعدُّ الفصل اللوني التبادلي للأيونات إلى حدٍ بعيد هو الأسلوب الأكثر استخداماً على نطاقٍ واسع؛ بسبب قابليته للتطبيق العام، وفصله الجيد، وقدرته العالية. ويمكن استخدامه في المرحلة الأولى من عملية التجهيز النهائي لتوفير التنقية وتقليل حجم سائل العملية. ويتم فصل المركبات على مبادل للأيونات وفقاً للاختلاف في شحنات سطحها. وتستخدم مبادلات الأنيونات (التي لها مجموعات موجبة الشحنة مثل الداي إيثيل أمينو إيثيل) لربط المواد المذابة سالبة الشحنة وتستخدم مبادلات الكاتيونات (التي لها مجموعات سالبة الشحنة، على سبيل المثال، الكاربوكسي ميثيل) لربط المواد المذابة موجبة الشحنة. وتتم إزالة المواد المذابة إما عن طريق زيادة تركيز الملح وإما عن طريق تغيير الرقم الهيدروجيني للطور المتحرك.

ويتم فصل المواد غير القطبية بدون تغيير عن طريق الفصل اللوني عكسي الطور على أطوار ثابتة ذات روابط كارهة للماء مرتبطة تساهمياً (سلاسل الألكيل–C_4، C_8، C_{18} أو المجموعات الوظيفية العطرية). ويتطلب التفاعل القوي للمذاب مع الطور الثابت إزالته من خلال استخدام المزيلات المائية العضوية. ويعتمد الفصل اللوني ذو التفاعلات الكارهة للماء (HIC) الذي يستخدم لتنقية البروتينات على التفاعلات الكارهة للماء الضعيفة نسبياً بين الروابط الكارهة للماء الضعيفة والأحماض الأمينية الكارهة للماء التي يمكن الوصول إليها على سطح البروتين. ويمكن تعزيز الادمصاص على الـ HIC عند تركيز الملح العالي في حين يتم تسهيل الإزالة عن طريق خفض تركيز الملح أو درجة الحرارة أو قطبية البيئة.

والفصل اللوني الانجذابي، على أساس التعرف الجزيئي، هو الصورة الأكثر انتقائية للفصل اللوني للبروتينات. وهو يستغل الارتباط الانتقائي للبروتين إلى رابطة انجذابية مقيدة على مصفوفة. وقد تكون الروابط تخصصية لبروتين أو مجموعة من البروتينات، وتتراوح من الأجسام المضادة، والمستقبلات، ونظائر أوساط التفاعل، والمثبطات، والعوامل المساعدة لأيونات المعادن، وقد تكون أيضاً ذات تخصصية حيوية زائفة مثل

الأصباغ الاصطناعية. وتكون الروابط الحيوية حساسة دائماً للتلف وأيضاً أكثر تكلفة. وعليه فإنها تستخدم في نهاية مخطط التنقية. ومن الناحية الأخرى، يمكن استخدام الروابط غير الحيوية مبكراً في عملية التنقية ويمكن أن تساعد على تقليل عدد خطوات الحصول على منتج نقي.

كما تم استغلال الفصل اللوني بشكلٍ كبير في الفصل الفراغي على أساس درجة اختلاف التفاعل بين الطور الثابت والنظائر الضوئية المختلفة، مما يؤدي بذلك إلى أوقات احتفاظ مختلفة ثم الفصل. ويوجد الكثير من الأطوار الثابتة الفراغية المتاحة ولكن أثبتت قلة فقط، مثل السكريات العديدة والأطوار القائمة على البروتينات، أنها تكون متعددة الاستعمالات. وقد تم اقتراح عملية للفصل اللوني هجينة مع التبلور حيث يمكن أن يوفر الفصل اللوني فصلاً أولياً جيداً للنظائر الضوئية، ويصبح أكثر اقتصاداً أن نجمع بينه مع التبلور لاسترداد المنتج الصلب في صورةٍ نقية (كيرال للتقنيات، كاليفورنيا، الولايات المتحدة الأمريكية). ومع ذلك، فإن التطوير الناجح لمثل هذه العملية الهجينة يعتمد على تصميم كلٍ من عمود الفصل اللوني والنظام التبلور.

(٨,٢,٦,٢) الفصل اللوني المستمر Continuous Chromatography

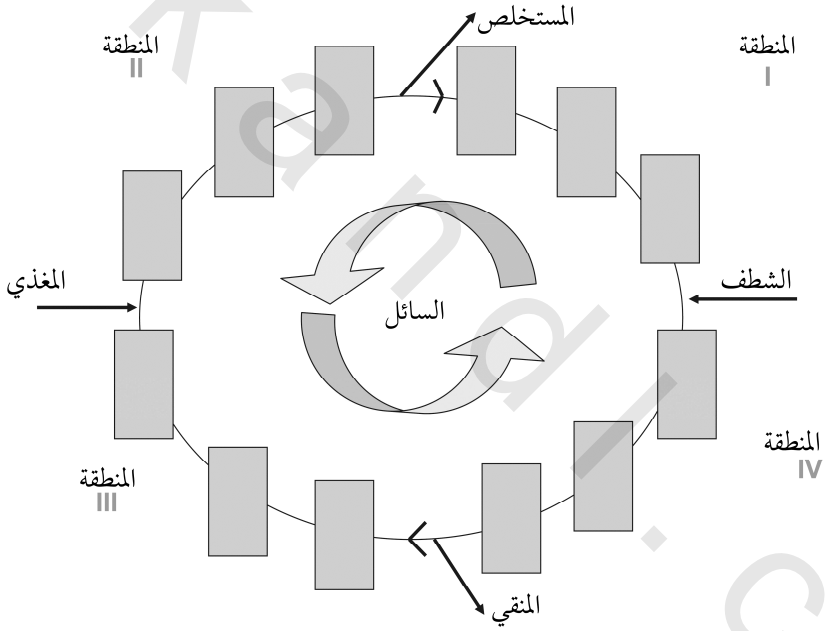
تقليدياً، كان إجراء الفصل اللوني يتم في وسادة معبأة عن طريق توظيف تمريرات متتابعة للمحلول المغذي، ومحلول الغسيل المنظم، ومحلول الإزالة خلال العمود. ولعزل المنتج المستهدف من محلول التغذية غير المصفى فإنه يتم تطبيق الفصل اللوني الادمصاصي باستخدام الوسادة المتخلخلة/ الممتدة [٣٤]. وهنا يتم ضخ المحلول المغذي في اتجاه صاعد خلال وسادة من جسيمات الممتزات معبأة في عمود عند معدل تدفق يؤدي إلى خلخلة الوسادة، مما يؤدي إلى مساحة بين حبيبات الممتزات، والسماح بذلك للجسيمات بالمرور. وتكون الوسادة الممتدة أكثر استقراراً من الوسادة المتخلخلة بسبب توزيع أحجام الجسيمات التي تتحرك إلى مستويات مختلفة، والسماح بالفصل المماثل لعمود الفصل اللوني المعبأ.

في الفصل اللوني المستمر يتحرك الممتز ومحلول الإزالة في اتجاهات معاكسة فيما يتعلق بنقطة إدخال العينة. ويتم هذا إما مع طريق وسادة متحركة، وإما مع طريق عمود متحرك، أو وضعية محاكية للوسادة المتحركة. ويمكن أن تكون حركة الوسادة وتدفق السائل عمودية أو معاكسة بالنسبة لكلٍ منهما. ويبدو أن التطبيق الممكن للفصل اللوني المستمر يمكن أن يكون كعملية إزالة للمنتج في الموقع لحصاد وفصل المنتجات من العمليات التخميرية أو الإنزيمية المستمرة.

وتقنية محاكاة الوسادة المتحركة (SMB) هي تقنية فصل لوني مستمر متعددة الأعمدة تنطوي على حركة معاكسة من السائل والطور الثابت الموجودين في الأعمدة [٣٥]. وعلى الرغم من تطبيقها على المستوى الكبير لما

يقرب من ٤٠ عاماً في صناعة البترول، فقد تم فقط مؤخراً الاعتراف بإمكاناتها في صناعات المواد الكيميائية الدقيقة، ومستحضرات التجميل والصناعات الدوائية. وقد تم استخدام الـ SMB لفصل السكريات والأحماض الأمينية والبروتينات، والمخاليط الراسمية، ولنزع الأملاح، ويمكن أيضاً أن تكون مفيدة في فصل النظائر الضوئية.

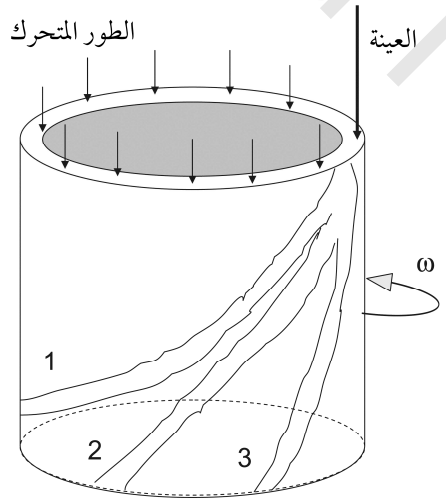
كما هو مبين في الشكل رقم (٨,١٧)، تنقسم الوسادة المتحركة التقليدية في الـ SMB إلى أربع مناطق: المنطقة I حيث يجب أن تتم إزالة المنتج الأقوى ارتباطاً تماماً، المنطقة II حيث يجب أن تتم إزالة المنتج الأقل ارتباطاً تماماً، المنطقة III حيث يجب أن يتم ادمصاص المنتج الأقوى ارتباطاً تماماً، والمنطقة IV حيث يجب أن يتم ادمصاص المنتج الأقل ارتباطاً تماماً. وتتكون الـ SMB النموذجية من ٤-٢٤ عموداً موزعة داخل المناطق المختلفة والتي تكون متصلة في محاذاة حلقية بصمامات متعددة الاتجاهات. والعوامل المهمة التي يجب مراعاتها في عملية الـ SMB هي معدلات تدفق التيارات المختلفة، وعدد الأعمدة، وطول العمود وقطره، وحجم الجسيمات، وفترة تحول الأعمدة، وتركيز المحلول المغذي.



الشكل رقم (٨,١٧). الفصل اللوني المحاكي للوسادة المتحركة. تتكون الوسادة المتحركة التقليدية من أربع مناطق مختلفة. يتم إدخال مخاليط التغذية إلى النظام بين المناطق I و II ويتم نقلها مع الطور المتحرك إلى المنطقة III، حيث يتم ادمصاص المركبات ذات الانجذابية العالية إلى المادة الماصة وتنقل مع الطور الثابت إلى المنطقة I حيث يتم إزالتها عن طريق مزيج من محلول إزالة جديد يتم إدخاله بين المناطق I و IV. يتم نقل المكونات الأقل ادمصاصاً في المنطقة III عن طريق الطور المتحرك إلى المنطقة IV حيث يتم ادمصاصها ونقلها مع الطور الثابت إلى المنطقة II للإزالة. ويتم التحكم في أحداث الامتزاز والإزالة المختلفة عن طريق معدلات التدفق التي يتم ضبطها بواسطة ٣ أو ٥ مضخات خارجية ومرات تبديل العمود، وقد تختلف معدلات التدفق من منطقة إلى منطقة. ويتم الحفاظ على التدفق الداخلي للطور المتحرك باستخدام مضخة إعادة تدوير التي عادةً ما توضع بين العمود الأول والأخير.

وتوفر الـ SMB وسيلة لزيادة إنتاجية الفصل اللوني، مع خفض في استهلاك محلول الإزالة وتخفيف المنتج. ومع ذلك، فإن قصور التقنية يكون؛ بسبب أن المحلول المغذي الذي يحتوي على خليط متعدد المكونات يمكن فقط أن ينقسم إلى تيارين من المنتج، كلاً منهما يمكن أن يكون له أكثر من مركب واحد. في حين يكون الوضع الأيزوقراطي هو الطريقة الأكثر شيوعاً لتشغيل النظام، فإن أنواعاً مختلفة من التدرجات، على سبيل المثال، المذيبات والملح والضغط، تسمح بتقليل أحجام محلول الإزاحة والراتنج عدة مرات. وقد استخدم مفهوم الـ SMB لتصميم مفاعل محاكي للوسادة المتحركة (SMBR)، والذي يتم فيه إضافة إنزيم ببساطة خلال وحدة الـ SMB سواءً في صورةٍ مقيدة أو إلى الطور المتحرك في صورةٍ قابلة للذوبان. وهذا يسمح للمادة البادئة بأن يتم تحويلها بشكلٍ مستمر في جميع أقسام الـ SMBR [٣٦].

والفصل اللوني الحلقي المستمر (CAC) هو الفصل اللوني الوحيد الذي يسمح بالفصل المستمر للخليط متعدد المكونات [٣٧]. يحتل الطور الثابت في الـ CAC مساحة حلقية مشكلة بين أسطوانتين متحدتي المركز، إحداها تغطي الأخرى. ويتم تدوير الوسادة الحلقية حول محورها العمودي بعد منفذ ثابت والذي يتم من خلاله تغذية العينة بصورةٍ مستمرة. ويترشح محلول الإزالة المنظم إلى الأسفل خلال باقي الحلقة. بمرور الوقت، تتشكل مجموعات مكونات حلزونية من نقطة التغذية إلى النقاط المختلفة في الجزء السفلي من العمود الحلقي (الشكل رقم ٨,١٨)، والتي تعتمد منحدراتها على سرعة الإزالة، وسرعة الدوران، ومعامل توزيع المكون بين طور السائل والممتز. وكلما كان امتزاز المادة المذابة أقوى ظهرت أبعد من نقطة الإدخال أسفل الوسادة. ويمكن أيضاً استخدام الإزالة غير الأيزوقراطية لفصل الـ CAC.



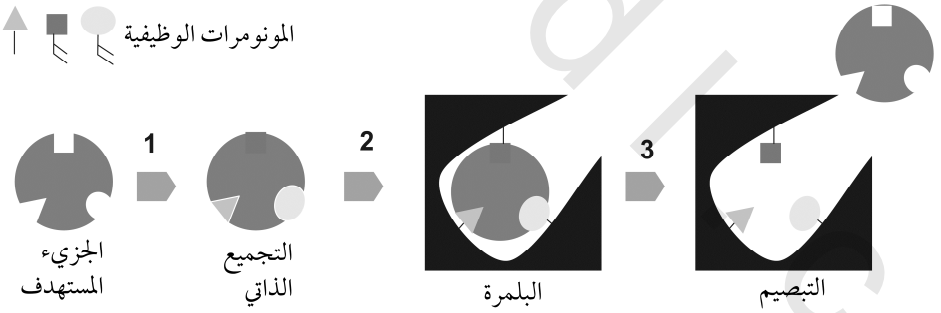
الشكل رقم (٨,١٨). الفصل اللوني الحلقي المستمر. يتم إدخال العينة في نقطة ثابتة إلى الوسادة الحلقية الدوارة للطور الثابت، بينما يتم إمرار الطور المتحرك على المساحة المتبقية. يتم فصل المكونات ١، ٢، و٣ الموجودة في العينة على أساس معامل توزيعها بين الطور الثابت والمتحرك، وتتم إزالتها عند نقاط مختلفة من العمود [٣٧].

obeikandl.com

(٨,٢,٧) مواد التبصيم الجزيئي لالتقاط المنتج انتقائياً

Molecularly Imprinted Materials for Selective Product Capture

إن التبصيم الجزيئي هو تقنية لإدخال مواقع تعرف انتقائية في شكل بصمة للجزيء المستهدف في مصفوفة بوليمر عالية الارتباط، ومن ثم توفير بنية ذات انتقائية عالية للغاية للفصل [٣٨]. لإعداد بوليمرات التبصيم الجزيئي (MIPs)، يتم ربط القالب (الجزيء المستهدف) مع مونومرات وظيفية في مذيب قبل إضافة بادئ الارتباط والبلمرة. بعد البلمرة، يتم إزالة القالب خارج شبكة البوليمر تاركاً بصمة لهيكل القالب (الشكل رقم ٨,١٩). ويسمح هذا بالتعرف التخصصي على الجزيء المستهدف وبالتالي يميز بين الجزيئات وثيقة الصلة في الخليط. ويمكن أن يتم إنتاج الـ MIP باستخدام نهج تساهمية أو غير تساهمية، على الرغم من تفضيل هذه الأخيرة بسبب بساطتها. في النهج الأول يتم اشتقاق القالب كيميائياً بواسطة جزيئات تحتوي على مجموعات قابلة للبلمرة باستخدام روابط تساهمية قابلة للعكس. في النهج غير التساهمي يتجمع القالب مع المونومرات الوظيفية باستخدام التفاعلات المختلفة مثل فان دير فال الكارهة للماء، أو الكهربائية. وقد استخدمت الـ MIPs للفصل اللوني لمجموعة واسعة من فئات المنتجات، بما في ذلك المركبات المماثلة هيكلياً، والنظائر الضوئية، والمصاوغات، وما إلى ذلك [٣٩، ٤٠]. كما تم استخدامها أيضاً كتقنية إزالة للمنتج في الموقع، على سبيل المثال لاسترداد مركبات الأيض الثانوية المنتجة عن طريق التخمير [٤١] والتخليق الإنزيمي للأسبارتام. وقد استخدمت هذه التقنية أكثر على النطاق التحليلي، ومع ذلك فهناك اهتمام كبير في تطبيقات المستوى الأوسع، ولكن هذا يتطلب تحسينات في قدرات ارتباط وتكاليف الـ MIPs.



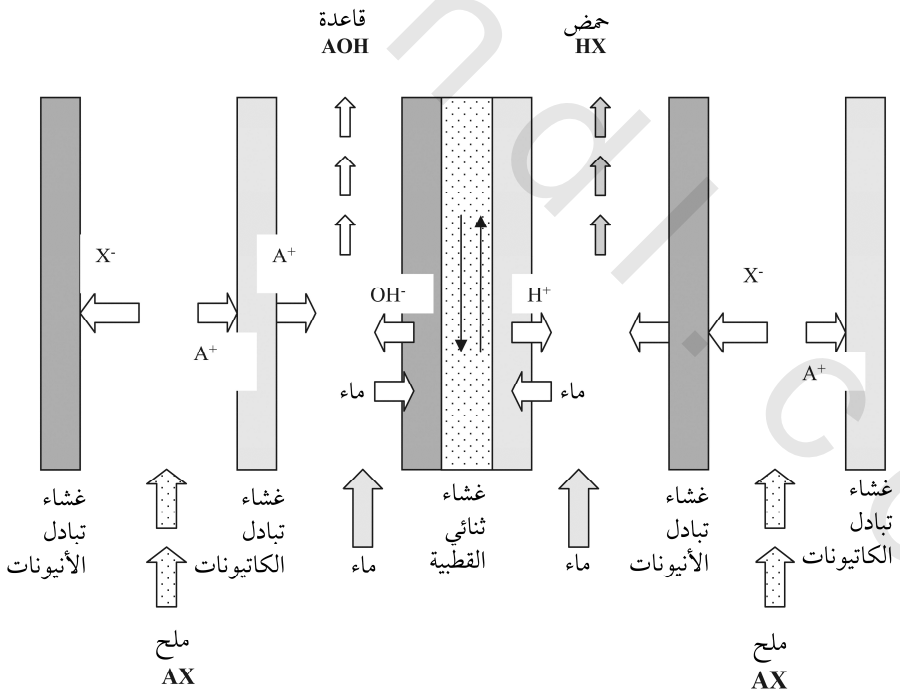
الشكل رقم (٨,١٩). تخليق بوليمر التبصيم الجزيئي عن طريق نهج غير تساهمي. تشمل الخطوات المختلفة: (١) التجميع الذاتي للجزيء المستهدف (قالب) مع المونومرات الوظيفية، (٢) البلمرة في وجود عامل الارتباط، و(٣) استخلاص القالب من شبكة بوليمر التبصيم. مجاملة من ماثيو لينوار، قسم التقنية الحيوية، جامعة لوند.

(٨,٢,٨) الفصل الغشائي للمواد المذابة الأيونية: الفصل الغشائي الكهربائي

Membrane Separation of Ionic Solutes: Electrodialysis

يستخدم الفصل الغشائي الكهربائي لفصل المركبات المتأينة من المركبات غير المتأينة بواسطة أغشية التبادل الأيوني تحت تأثير من تدرج الجهد. وتسمح الأغشية ذات المجموعات المشحونة الثابتة انتقائياً بمرور الأيونات

المشحونة المعاكسة وترفض أيونات الشحنة العكسية، مما يسمح بالتركيز، وإزالة أو فصل المحاليل الكهربائية. وقد تم تطوير الفصل الغشائي الكهربائي ثنائي القطب أو "تقسيم الماء" لتحويل محاليل الملح المائية إلى أحماض وقواعد وقد تم تطبيقه لاسترداد الأحماض العضوية من بيئة التخمير بدون إضافة المواد الكيميائية. ويستند المبدأ على استخدام الأغشية ثنائية القطب التي يتم فيها صف الأغشية المنفذة للأنيونات والكاتيونات معاً. وبتوجيه مثل هذه البنية المركبة بحيث تواجه طبقة تبادل الكاتيونات القطب الموجب وفرض مجال جهد عبر الغشاء فإنه من الممكن تقسيم الماء إلى أيونات هيدروجين$^{+}$ وهيدروكسيل$^{-}$ مما يسبب ترحيل الأيونات إلى القطب ذو الشحنة العكسية. وهذا يؤدي إلى إنتاج محاليل حمضية وقاعدية على أسطح الأغشية ثنائية القطب. وعند وضع أغشية ثنائية القطب متعددة مع أغشية تبادل للأنيونات والكاتيونات في متراص للفصل الغشائي الكهربي بين زوجٍ واحد من الأقطاب الكهربائية فإنه يمكن تحويل محاليل الملح المائية إلى أحماض وقواعد (الشكل رقم ٨,٢٠). وعيب الأغشية ثنائية القطب هو عدم تحملها للكاتيونات متعددة التكافؤ، مثل الكالسيوم والماغنيسيوم التي تشكل هيدروكسيدات غير قابلة للذوبان على السطح البيني الحرج للأغشية ثنائية القطب حيث تنفصل الأيونات. وبالتالي فإنه من الضروري إزالة هذه الأيونات لمنع فساد الأغشية ثنائية القطب.



الشكل رقم (٨,٢٠). الفصل الغشائي الكهربائي ثنائي القطب. يؤدي الغشاء ثنائي القطب الواقع بين غشاء تبادل للأنيونات والكاتيونات إلى تقسيم المياه إلى أيونات هيدروجين$^{+}$ وهيدروكسيل$^{-}$ والتي تستخدم في متراص للفصل الغشائي الكهربائي للجمع بين أنيونات وكاتيونات الملح لإنتاج الأحماض والقواعد.

(٨,٢,٩) الفصل الفراغي باستخدام الأغشية Chiral Separations Using Membranes

إلى جانب الفصل اللوني، توفر الأغشية تقنية محتملة قابلة لزيادة المستوى [٤٢]. ويمكن الاستفادة من غشاء انتقائي للنظائر الضوئية من أجل السماح بالنقل الانتقائي لأحد النظائر الضوئية من خليط راسمي أو غشاء غير انتقائي لتسهيل عملية انتقائية للنظائر الضوئية.

يمكن أن يكون الغشاء الانتقائي للنظائر الضوئية بوليمر كثيف أو سائل (الذي هو نفسه فراغي أو له مجموعة مضافة فراغية). ويمكن تصميم غشاء سائل لاحتواء ناقل انتقائي للنظائر الضوئية يشكل بصورةٍ انتقائية متراكب مع أحد النظائر من خليط راسمي في محلول التغذية، وينقله عبر الغشاء، ويحرره على الجانب الآخر. ورغم أنه يمكن الحصول على انتقائيات عالية في مثل هذه الأنظمة، إلا أن الأغشية السائلة تفتقر إلى الاستقرار على مدى فترات طويلة من الزمن وغالية الثمن للتشغيل على النطاق الواسع.

يمكن صنع غشاء البوليمر الانتقائي للنظائر الضوئية من دعامة مسامية غير انتقائية مغلفة بطبقة رقيقة من بوليمر انتقائي للنظائر الضوئية، أو غشاء ترشيح فائق ذي عنصر فراغي مقيد، أو بوليمرات التبصيم الجزيئي (كما هو موضح أعلاه). وحيث إن النقاء الضوئي المطلوب غالباً لا يمكن تحقيقه في خطوةٍ واحدة، فإنه يمكن استخدام سلسلة من وحدات الغشاء الفراغي.

(٨,٢,١٠) الإزالة بالتجفيف/ المذيبات Drying/Solvent Removal

عادةً ما تستخدم إزالة المياه المتبقية أو المذيبات خلال المراحل النهائية لتجفيف المنتج ليكون جاهزاً للتخزين، ولكن قد تكون هناك حاجةً لها أيضاً خلال المراحل الأولى من عملية التجهيز النهائي كوسيلة لتركيز المنتج من المحاليل المخففة. وتتوفر مجموعة متنوعة من أساليب ومعدات التجفيف ويتم تصنيفها وفقاً لطريقة انتقال الحرارة، على سبيل المثال، التوصيل (أي من خلال الاتصال مع سطح ساخن)، والحمل الحراري (على سبيل المثال، عن طريق الرش في غاز جاف ساخن)، والإشعاع، أو مزيج من هذه الطرق. ويمكن إضافة إضافات مختلفة إلى المنتج قبل التجفيف للحفاظ على الاستقرار، وتحسين ذوبان المنتج، ...إلخ.

ويمكن إجراء التجفيف لكميات أقل من المنتجات في غرفة حيث يوضع المنتج على أرفف ويحدث نقل الحرارة جزئياً عن طريق التوصيل وجزئياً عن طريق الحمل الحراري. وعلى النطاق الأوسع، يتم تسهيل التجفيف على دفعات في الكثير من مجففات التوصيل عن طريق استخدام الطبقات المنتقلة ميكانيكياً لتوفير جهد حراري موحد على المواد التي يجري تجفيفها، وإنتاجية عالية، وإمكانية التطوير لعملية مستمرة. يتم إزالة المياه في مجففات الأسطوانة الدوارة عن طريق التوصيل الحراري على طبقة رقيقة من المحلول على سطح مسخن بالبخار لأسطوانة دوارة.

والتجفيف بالرذاذ هو المثال الأكثر أهمية لطريقة التجفيف بالحمل الحراري للمنتجات الحيوية، وينطوي على توليد رذاذ جوي من قطيرات صغيرة عن طريق فوهة أو قرص دوار، وتوجيهها إلى تدفق من الغاز الساخن (١٥٠–٢٥٠ درجة مئوية). ويحدث التبخير بسرعة تاركاً وراءه جزيئات المنتج الصلبة.

ويمثل التجفيف التجميدي أو التجفيد واحداً من أقل الأساليب قسوة ويستخدم لتجفيف المنتجات الصيدلانية. ويستند مبدأ التجفيف على تسام السائل من المواد المجمدة.

(٨,٣) أمثلة على التجهيز النهائي لمجموعات المنتجات المختلفة

Examples of Downstream Processing of Different Product Groups

(٨,٣,١) الكحولات Alcohols

إن الإيثانول والبيوتانول (الأسيتون–بيوتانول) هما الكحولان المنتجان عن طريق التخمير تحت الظروف اللاهوائية. وقد جذب كلاً منهما الاهتمام ليس فقط للتطبيق كوقود حيوي ولكن أيضاً كجزيئات أولية لإنتاج المواد الكيميائية الأخرى. ويعد الإيثانول حالياً منتجاً رئيساً في جميع أنحاء العالم (حوالي ٩ مليارات جالون خلال ٢٠٠٦م)، ومن المتوقع زيادة إنتاجه خلال السنوات القادمة في الكثير من البلدان. وتختلف المواد الخام المستخدمة تبعاً للمنطقة، على سبيل المثال، يستخدم قصب السكر في البرازيل في حين يكون نشا الذرة في الولايات المتحدة في المقام الأول.

عادةً تستخدم العمليات الصناعية لإنتاج الإيثانول التقطير كخطوة الاسترداد الرئيسة. ويرجع حوالي ٤٠٪ من إجمالي الطاقة اللازمة لتحويل الذرة إلى الإيثانول إلى تكاليف التقطير. وقبل التقطير، يتم تسخين سائل التخمير (البيرة) وإرساله من خلال أسطوانة مفرغة للغاز لتبخير البخار المحتوي على الإيثانول في المقام الأول والماء مع بعض ثاني أكسيد الكربون المتبقي. ويتم تكثيف أبخرة الإيثانول والماء بعد ذلك ويتحدا مع تيار السائل الذي يتم إدخاله إلى عمود التقطير، في حين يتحد أي بخار غير متكثف مع ثاني أكسيد الكربون المنتج أثناء التخمير ويتم إرساله من خلال جهاز تنقية ثاني أكسيد الكربون. وتتم إزالة حوالي ٩٠٪ من الإيثانول خلال التقطير بنسبة ٤٠٪ من وزن بخار الإيثانول/ الماء. ويجري استرداد الإيثانول لاحقاً من عمود تقطير البيرة من خلال عمل مشترك من المقوم، والمجرد، والمناخل الجزيئية. ويخرج أكثر من ٩٩٪ من الإيثانول من الجزء العلوي للمقوم كناتج تقطير. ويتم تغذية المنتج المتبقي في أسفل إلى عمود التجريد لإزالة المياه الإضافية ثم مزج الإيثانول المقطر من التجريد مع المحلول المغذي إلى المقوم. ويتم تغذية ناتج التقطير من المقوم الذي يحتوي أساساً على الإيثانول، إلى المناخل الجزيئية، والتي تقبض على آخر آثار المياه لتعطي إيثانول بدرجة نقاء ٩٩,٦٪ [٤٣]. ويتم إنتاج وقود الإيثانول بعد خلط الإيثانول المنقي مع ما يقرب من ٥٪ من البنزين المغير طبيعته.

ويتم تغذية بقايا الجزء السفلي من عمود البيرة التي تحتوي على كمية كبيرة من الماء والمواد غير القابلة للتخمير مثل البروتين، والزيوت، والألياف، والمواد الكيميائية غير المستهلكة أثناء التخمير (تصل إلى ١٥٪ مواد صلبة) إلى وعاء التخزين، وطردها مركزياً لإزالة أكثر من ٨٠٪ من المياه معطيةً حبوب تقطير رطبة بتركيز ٣٧٪ مواد صلبة. ويعاد تدوير جزء من المياه من المنتج السائل والمعروف باسم الرقيق مرةً أخرى لعملية تسييل النشا في حين يتم تغذية المتبقي إلى المبخر. ويتم خلط المركز من المبخر مع حبوب التقطير الرطبة وتجفف في مجففات الأسطوانة الدوارة.

في عملية بيوستيل®٢٠٠٠م لإنتاج الإيثانول (شيماتور للهندسة، السويد) (الشكل رقم ٨,٢١)، تتم إزالة الكحول بشكلٍ مستمر من عملية التخمير، والحفاظ على تركيز الكحول بنسبة ٤,٥٪ وزناً. ويتم تغذية محلول التخمير لفواصل طرد مركزي لفصل الخميرة التي يتم إعادة تدويرها إلى المخمر، في حين تتم معالجة البيرة الرائقة على النحو الوارد سابقاً. ويتم ضخ معظم البيرة منخفضة الإيثانول (البيرة الضعيفة) بعد التقطير من خلال مبادل حراري متجدد ونظام تبريد قبل أن يتم إعادة تدويرها إلى المخمر.

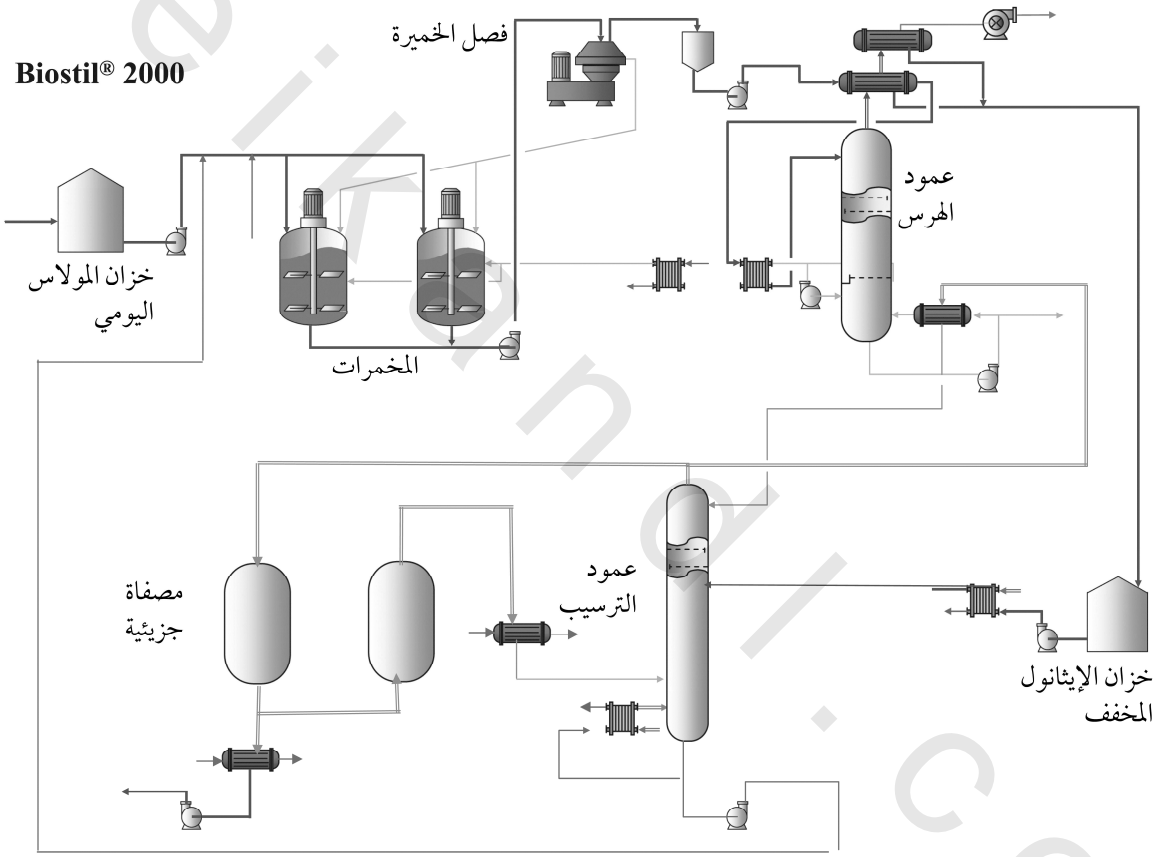
وقد تم اقتراح التبخير المسبق كوسيلة بديلة لاسترداد الإيثانول. ويكون مخطط التجهيز النهائي هو إزالة الكحول من محلول التخمير بواسطة التبخير المسبق، وتركيزه إلى حوالي ٨٠٪ عن طريق التقطير، وفي النهائية يتم استخدام التبخير المسبق لتحضير الإيثانول النقي. وقد أشارت دراسات مختلفة إلى إمكانات التبخير المسبق لتحسين اقتصاديات العملية، ولكنها تقترح تحسينات في أداء الغشاء والتكاليف [٤٤]. ولاسترداد الإيثانول من المحلول الخام، فإن أغشية التبخير المسبق المتاحة لها انتقائية منخفضة وتتدهور مع الوقت؛ بسبب ادمصاص المكونات الأخرى مثل الأحماض والجلسرين. وقد أظهر تعديل الأغشية أنه يحسن الأداء [٤٥].

(٨,٣,٢) الأحماض العضوية Organic Acids

تشكل الأحماض العضوية مجموعة مهمة من المواد الكيميائية التي تنتج عن طريق التخمير. وبينما يعدُّ أن حمض الخليك والسيتريك منتجات تقليدية، فقد تزايد الاهتمام في إنتاج حمض اللاكتيك والسكسينيك تخميرياً كمواد كيميائية أولية بصورةٍ كبيرة خلال العقد الماضي.

وتوجد عدة طرق قابلة للتطبيق لاسترداد الأحماض العضوية؛ إلا أن الوسائل التقليدية لاستردادها كأملاح للكالسيوم لاتزال تمارس على نطاقٍ واسع [٤٦-٤٩]. يتم إضافة فائض من هيدروكسيد/ كربونات الكالسيوم لمعادلة الحمض أثناء التخمير، ويمكن الحصول على ملح الكالسيوم للحمض كراسب أو ابقائه في المحلول. ويساعد هذا الأخير في فصل المنتج بسهولة من الخلايا والجسيمات الأخرى. وفي نهاية التخمير يتم ترشيح المحلول

لإزالة المواد الصلبة، ومعالجته بالكربون، وتبخيره، وترويقه بحمض الكبريتيك لتحويل الملح إلى الحمض الحر ويتم ترشيح كبريتات الكالسيوم المتكونة. ويمكن تنقية الرشيح أكثر باستخدام أعمدة الكربون والتبادل الأيوني والتبخير لإنتاج منتج ذي درجة تقنية. ويتم تحويل حمض اللاكتيك ذو الدرجة التقنية إلى المنتج عالي النقاوة الثابت حرارياً عن طريق الأسترة بالميثانول أو الإيثانول، واسترداد الأستر عن طريق التقطير، متبوعاً بالتحليل المائي، والتبخير، وإعادة تدوير الكحول. والعيب الرئيس لهذه العملية هو الكميات الكبيرة من كبريتات الكالسيوم الناتجة كمنتج جانبي.



الشكل رقم (٨,٢١). عملية بيوستيل®٢٠٠٠م لإنتاج الإيثانول. يتم استرداد الإيثانول باستمرار من محلول التخمير للحفاظ على تركيز منخفض في المخمر. فصل خلايا الخميرة يتم بواسطة الطرد المركزي ثم إعادة تدويرها إلى المخمر، في حين يتم إرسال المحلول الرائق (البيرة) إلى عمود التقطير (الهريس) حيث تتم إزالة الإيثانول حوالي ٤٠٪ إيثانول/ بخار ماء (الإيثانول الضعيف). ويتحقق الاسترداد اللاحق للإيثانول النقي من نواتج التقطير عن طريق المقوم والتجريد، وتتم إزالة آخر البقايا للماء بواسطة المناخل الجزيئية. مجاملة من شيماتور للهندسة، كارلسكوجا، السويد.

واستخلاص السائل من السائل باستخدام مستخلص رباعي الأمين الكاره للماء (ألامين®٣٠٤-١) هو أسلوب تقليدي لاسترداد الأحماض العضوية من محلول التخمير. ويتم تجريد المذيب المحمل بالماء الساخن. ويسمح هذا باسترداد الحمض الحر بدلاً من الملح المقابل. ويتم تبخير الماء لإعطاء الحمض المتبلور [٥٠]. وتتم إعادة تدوير خليط المذيب والأمين المجدد. وقد تم تطبيق هذا الأسلوب لجميع الأحماض العضوية وتم اعتباره طريقة تنقية فعالة واقتصادية. وفي الآونة الأخيرة، تم تطوير عملية استرداد متكاملة لحمض السكسينيك مكونة من الاستخلاص التفاعلي، والتقطير التفريغي، والبلورة، منتجةً نقاء لحمض السكسينيك بدرجة ٩٩,٨٪ وإنتاجية حوالي ٧٣٪ من محلول تخمير مانهيميا ساكسينيسيبرودوسينس [٥١]. ويساعد التقطير التفريغي على إزالة حمض الخليك من المنتج.

وقد تم ذكر تطوير آخر للاستخلاص باستخدام تقنية رباعي الأمين/ الكربونات. ويتم استخلاص حمض اللاكتيك المنتج على صورة لاكتات الصوديوم، من المحلول المركز بواسطة خليط من رباعي الأمين والمذيب تحت ضغط من ثاني أكسيد الكربون، مما يعطي راسب من بيكربونات الصوديوم ومستخلص أمين-حمض اللاكتيك. بينما يتم الحصول على حمض اللاكتيك بواسطة الاستخلاص الرجعي بالماء الساخن عند ١٤٠ درجة مئوية و١٠٠ رطل لكل بوصة مربعة، ويتم تسخين بيكربونات الصوديوم لإنتاج كربونات الصوديوم وثاني أكسيد الكربون ويتم إعادة تدويرهما في العملية.

وقد اجتذب الفصل الغشائي الكهربائي الكثير من الاهتمام لإنتاج حمض اللاكتيك؛ لأنه لا ينتج نفايات ملحية [٥٢]. يتم تغذية محلول التخمير بعد الترشيح الدقيق إلى وحدة الفصل الغشائي الكهربائي. وقد تم تطوير وضعية عملية تسمي عملية "ED المزدوجة" والتي تستخدم وحدة فصل غشائي كهربائي لإزالة الملح لإزالة الكاتيونات متعددة التكافؤ وتركيز ملح اللاكتات، يليها وحدة الفصل الغشائي الكهربائي عن طريق "تقسيم المياه" مع أغشية ثنائية القطب حيث يتم تحويل الأنواع الأيونية لصور حمضها وقاعدتها المعادلة وفصلها. ويتم تحويل لاكتات الصوديوم إلى حمض اللاكتيك الذي يتم تخصيبه أثناء تقدم العملية. ويتم نقل أيونات الصوديوم عبر الغشاء الكاتيوني وترتبط مع أيونات الهيدروكسيل لتكوين هيدروكسيد الصوديوم الذي يتم إعادة تدويره للتخمير. وهذا يتيح للعملية أن تعمل بكفاءة واقتصاد. وقد تم تطوير طريقة مماثلة لاسترداد حمض السكسينيك النقي والتي يتم تمريرها بعد ذلك من خلال جهاز البلورة التبخيري لإنتاج بلورات نقية جداً [٥٣، ٥٤].

(٨,٣,٣) الأحماض الأمينية Amino Acids

كانت الأحماض الأمينية بين المنتجات الأولى التي تصنع عن طريق التخمير على نطاقٍ صناعي. وفي عملية تجهيز نهائي نموذجية لاسترداد حمض أميني، يتم فصل الخلايا عن طريق الطرد المركزي أو الترشيح متبوعاً بإزالة

اللون من المحلول الرائق قبل المرور على عمود التبادل الأيوني. وتتم إزالة الحمض الأميني المرتبط وبلورته (بعد التبخير)، يليه مزيد من التكييف بواسطة التجفيف والغربلة. ويتم إنتاج بعض الأحماض الأمينية (على سبيل المثال، إل-ثريونين) في تركيزات عالية جداً مع كميات منخفضة جداً من المنتجات الجانبية، ويمكن بلورته مباشرةً دون الحاجة إلى خطوة التبادل الأيوني.

(٤ ,٣ ,٨) الإنزيمات والبروتينات/ الببتيدات Enzymes and Proteins/Peptides

تشمل البروتينات مجموعة متنوعة من الجزيئات الكبيرة المختلفة في التكوين، والحجم وخصائص السطح، والوظيفة؛ ويتم استغلال هذه الاختلافات في فصل البروتينات عن بعضها ببعض. والإنزيمات الضخمة هي من بين البروتينات المتاحة تجارياً (على سبيل المثال، الأميليزات، والزيلانيزات، والبروتييزات، والليبيزات) والإنزيمات التشخيصية (مثل الجلوكوزأوكسيديز، والبيروكسيديز، واليوريز)، والبروتينات العلاجية (على سبيل المثال، الأجسام المضادة وحيدة النسيلة، وهرمون النمو البشري، والأنسولين). وتحدد تطبيقات البروتينات درجة التنقية المطلوبة؛ فالإنزيمات الضخمة هي تحضيرات خام نسبياً، ومركزة يتم صياغتها لتلبية الاحتياجات للنشاط والاستقرار، في حين تتطلب البروتينات العلاجية مستويات عالية جداً من النقاء (>٩٩٪).

حالياً، يتحقق إنتاج البروتينات على النطاق الواسع أساساً باستخدام مجموعة متنوعة من العوائل المؤتلفة بما في ذلك البكتيريا والخمائر والفطريات والخلايا الثديية. وغالباً ما يحدد العائل المنتج اختيار طريقة فصل الصلب من السائل وطريقة تحلل الخلايا النهائية المستخدمة. ويعتمد موقع المنتج المستهدف خارج/ داخل الخلايا أو قبل الغشاء البلازمي أيضاً على العائل. وعادة ما يتم تفضيل إفراز البروتينات إلى البيئة خارج الخلايا من أجل تجنب خطوة تمزيق الخلايا القاسية، وأيضاً لأنه في هذه الحالة يجب التعامل مع عدد أقل من الملوثات خلال التنقية. ويتم إنتاج الإنزيمات الضخمة دائماً خارج الخلية؛ وبعد ترويق المحلول يتم تركيز الإنزيمات عن طريق الترسيب أو الترشيح الفائق وعادةً ما تتم صياغتها كمنتجات سائلة.

يمكن أن يؤدي إنتاج البروتينات داخل الخلايا في إيشيريشيا القولون إلى التعبير عنها كأجسام مشتملة غير قابلة للذوبان، والتي لديها ميزة كونها بروتين نقي تماماً. ومع ذلك، فإن استرداد البروتين النشط يتطلب إذابة البروتين المتجمع في ظل ظروف مغيرة لطبيعته يليها إعادة طي للبروتين المذاب عن طريق الإزالة البطيئة للعامل المغير للطبيعة [٧].

وعادةً ما تتم التنقية عالية الدرجة للبروتينات باستخدام طرق فصل لونية مختلفة اعتماداً على خصائص سطحها و/ أو خصائص التعرف الجزيئي. وتعتمد المصفوفات المستخدمة للفصل اللوني للبروتينات عادةً على المواد الهلامية المحبة للماء مثل الأجاروز. وتتطلب تنقية البروتينات العلاجية عدداً من خطوات التلميع لإزالة كافة

الملوثات الناشئة من العائل المنتج (على سبيل المثال، الدنا، والفيروسات، والسموم الداخلية، وبروتينات خلية المضيف)، وبيئة الزراعة، وكذلك المتغيرات المتحللة والمتجمعة للمنتج. ويمكن إجراء التنقية الانتقائية للبروتين من المحلول الخام الرائق بفضل بروتين انجذاب التاج المنصهر وراثياً مع البروتين. وامتداد بقايا الحمض الاميني الهيستيدين هي واحدة من العلامات الأكثر شيوعاً للتمكين من تنقية البروتين المؤتلف بواسطة الفصل اللوني الانجذابي ذي أيون المعدن المقيد.

وقد تم أيضاً استخدام النظم المائية ثنائية الطور أو الفصل اللوني ذي الوسادة الممتدة لاستعادة البروتينات مباشرةً من المواد الأولية غير الرائقة. ويسمح هذا بدوره بخفض عدد الخطوات التجهيز النهائي.

(٨,٣,٥) المضادات الحيوية Antibiotics

كما هو الحال في الأحماض الأمينية، فإن المضادات الحيوية كانت بعضاً من منتجات التقنية الحيوية سابقة النجاح. وتقنية الفصل الرئيسة لتنقيتها هي إما استخلاص السائل من السائل وإما الادمصاص. والبنيسيلين، والتتراسيكلين، والإريثروميسين، والباسيتراسين هي أمثلة على المضادات الحيوية التي تمت تنقيتها عن طريق الاستخلاص. يتم استخلاص البينيسيلين والتتراسيكلين عند قيمة أس الهيدروجيني منخفضة في حين يتم إجراء استخلاص الإريثروميسين عند درجات أس هيدروجيني مرتفعة، وذلك باستخدام المذيبات مثل خلات البيوتيل. وبأخذ البنيسيلين كمثال، يبدأ التجهيز النهائي بالترشيح لفصل فطر البنسيليوم نوتاتوم، ويتم تبريد الرشيح إلى درجة صفر–٤ قبل إضافة كبريتات الأمونيوم أو حمض التانيك لتحفيز ترسيب البروتين. ويتم خفض درجة الرقم الهيدروجيني للرشيح الرائق إلى ما دون pK_a للبنيسيلين متبوعةً بالاستخلاص باستخدام مذيب (أسيتات البيوتيل) بنسبة إلى المحلول ١,٠. وتتم معالجة المذيب المحتوي على البنيسيلين بالكربون المنشط ثم الاستخلاص الرجعي بمحلول الفوسفات المائي المنظم (درجة الحموضة ٥–٧,٥) عند نسبة محلول منظم إلى مذيب ١,٠–٢,٠. ويمكن إعادة هذه العملية وفي نهاية المطاف يتبلور المضاد الحيوي سواءً من الطور المائي أو المذيب في مفاعل التقليب الحيوي. ويتم فصل البلورات بواسطة الترشيح، وغسلها بمذيبات متطايرة نسبياً لإزالة الشوائب المتبقية، وتجفيفها تحت تفريغ، وفي النهاية مع الهواء الساخن. يتم استرداد المذيب المستخدم في الاستخلاص بواسطة التقطير ويعاد تدويره.

(٨,٣,٦) الكاروتينات Carotenoids

كان هناك اهتمام متزايد خلال الـ ١٠–٢٠ سنة الماضية في تطوير المصادر الميكروبية للكاروتينات المهمة صناعياً لاستخدامها في الأغذية والأعلاف، والمستحضرات الصيدلانية ومستحضرات التجميل [٥٥]. وقد تم

أيضاً تطوير التحسينات في العوائد من المصادر الميكروبية عن طريق الطفرات أو العمليات المعتمدة على هندسة مسارات تخليق الكاروتينات. ويتم إنتاج منتجات الكاروتينات الميكروبية من جنس الدوناليلا، والهيماتوكوكس بلوفياليس والفافيا رودوزيما تجارياً.

على الرغم من أنه يمكن استخدام الكتلة الحيوية الكلية كمصدر للكاروتينات، إلا أنه يجب استخلاص الكاروتينات في تطبيقات الأغذية والصحة. وقد تم تطبيق وسائل مختلفة لاستخلاص وتنقية الكاروتينات من مزارع الطحالب. والاستخلاص بالمذيبات من الكتلة الحيوية المجففة المطحونة هو وسيلة شائعة لاسترداد الكاروتينات. في عملية الإنتاج التجاري للأستازانثين بواسطة الهيماتوكوكس بلوفياليس، يتم تحرير الكاروتين المتراكم في خراجات الطحالب بواسطة طحن الخراجات الجافة عند −١٧٠ درجة مئوية في وجود المواد المضادة للأكسدة. وقد وجد أن الاستخلاص بثاني أكسيد الكربون فوق الحرج يكون فعالاً للاسترداد الكمي للأستازانثين وغيره من الكاروتينات من الهيماتوكوكس بلوفياليس المطحونة المجفدة والمسحوقة [٥٦].

وقد أدى الفصل اللوني المعاكس إلى استرداد وجودة عاليين للزياكسانثين من مستخلص خام تم الحصول عليه بواسطة الاستخلاص بالمذيبات من الطحلب الدقيق المتصبن ميكروسيستيس إيروجينوزا [٥٧].

(٨,٣,٧) المستحلبات الحيوية Biosurfactants

المستحلبات الحيوية هي جزيئات نشطة سطحياً يتم إنتاجها من قبل مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة. ومن الممكن أيضاً إنتاج المستحلبات الحيوية القائمة على السكر (على سبيل المثال، أسترات السكر وجليكوسيدات الألكيل) باستخدام التخليق الإنزيمي. على الرغم من أن الإنتاج الصناعي لا يزال محدوداً، فقد أثارت المستحلبات الحيوية الاهتمام لمجموعة متنوعة من التطبيقات مثل معالجة البيئة، وتحسين استخراج النفط، ومستحضرات التجميل ومستحضرات الأدوية؛ بسبب قابليتها للتحلل الحيوي، وسميتها المنخفضة، وثباتها العالي في درجة الحموضة العالية. وقد ذكرت عدة طرق لاسترداد المستحلبات الحيوية، مثل الترسيب بالأحماض، والاستخلاص بالمذيبات، ترسيب كبريتات الأمونيوم، والتبلور، والطرد المركزي [٥٨]. وقد ذكرت أيضاً بعض الإستراتيجيات غير التقليدية الأخرى التي تستفيد من النشاط السطحي وقدرتها على تكوين المذيلات و/أو الحويصلات، والتي تكون قابلة للتطبيق للاسترداد المستمر على المستوى الكبير للمستحلبات الحيوية من محاليل المزارع. وهي تشمل تجزئة الرغوة، والترشيح الفائق، والادمصاص على راتنجات البوليستيرين، و الفصل اللوني التبادلي للأيونات.

(٨,٣,٨) البولي هيدروكسي ألكانوات Polyhydroxyalkanoates

تمثل البولي هيدروكسي ألكانوات (PHAs) فئة معقدة من بولي أسترات التخزين التي تترسب كمشتملات داخل الخلايا غير قابلة للذوبان في عدد من الكائنات الحية الدقيقة [٥٩]. تمتلك الـ PHAs خصائص مواد مشابهة لمختلف اللدائن الحرارية الاصطناعية واللدائن المستخدمة حالياً (من البروبيلين إلى المطاط الصناعي)، ولكن لديها ميزة كونها غير سامة، ومتوافقة حيوياً، وقابلة للتحلل الحيوي [٦٠]. وتشمل الكائنات الحية الدقيقة التي تنتج كميات عالية من الـ PHAs الألكاليجينز لاتوس، والأزوتوباكتر فينيلاندي، والكوبريافيداس نيكاتور (التي كانت تسمى سابقاً رالستونيا يوتروفا)، ولكن يتم الإنتاج التجاري للبوليمر باستخدام إيشيريشيا القولون المؤتلفة. وقد تم تحقيق استرداد البولي (٣-هيدروكسي بيوتيرات) (PHB) بواسطة طرق متنوعة مثل التمزيق الميكانيكي للخلايا، والتحلل الفيزيائي والكيميائي، والإنزيمي للخلايا الميكروبية، وتركيبات من الطرق المختلفة [١٧، ٦١، ٦٢]. ومن المعروف أن الاستخلاص بالمذيبات يؤدي إلى تنقية مناسبة للـ PHB مع انخفاضات متواضعة في وزنه الجزيئي [٦٣]، ولكن هذه الطريقة باهظة التكلفة، وتخلق مشكلات في التصريف، وتغير في مورفولوجية حبيبات البوليمر. ويعدُّ التمزيق الكيميائي للخلايا لتحرير الـ PHB من الكتلة الحيوية واحداً من أكثر الخيارات فاعلية واقتصادية [٦٤]. ويؤدي استخلاص البوليمر عن طريق هضم الخلايا بمحلول الأمونيا المائي، وهيدروكسيد الصوديوم أو هيدروكسيد البوتاسيوم من الأزوتوباكتر فينيلاندي وإيشيريشيا القولون المؤتلفة، على التوالي، إلى ارتفاع استرداد البوليمر النقي [٦٤، ٦٥].

شكر وتقدير Acknowledgements

يعبر المؤلف عن امتنانه لمؤسسة بحوث البيئة الإستراتيجية (ميسترا) للدعم المالي.

المراجع References

[١] Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. (2001) Downstream processing in biotechnology, in *Basic Biotechnology* (eds C. Ratledge and B. Kristiansen), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 187-211.

[٢] Mattiasson, B. and Holst, O. (eds) (1992) *Extractive Bioconversions*, Marcel Dekker, New York.

[٣] Freeman, A., Woodley, J.M., and Lilly, M.D. (1993) *In situ* product removal as a tool for bioprocessing. *Biotechnology*, **11,** 1007-1012.

[٤] Lye, G.J. and Woodley, J.M. (1999) Application of *in situ* product removal techniques to biocatalytic processes. *Trends Biotechnol.*, **17,** 395-402.

[٥] Schügerl, K. (2000) Integrated processing of biotechnology products. *Biotechnol. Adv.*, **18,** 581-599.

[٦] Stark, D., Jaquet, A., and von Stockar, U. (2003) *In-situ* product removal in whole cell bio-technology during the last 20 years. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **80,** 149-175.

[٧] Stephanopolous, G. (ed.) (1993) *Biotechnology Volume 3, Bioprocessing* (series editors: H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, and P. Stadler), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[٨] Medronho, R.A. (2003) Solid-liquid separation, in *Isolation and Purification of Proteins* (eds R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson), Marcel Dekker, New York, pp. 131-190.

[٩] Doran, P.M. (1995) *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, London.

[١٠] Krijgsman, J. (1992) *Product Recovery in Bioprocess Technology*, BIOTOL Series (ed. R.O. Jenkins), Butterworth Heinemann, Oxford.

[١١] Ulber, R., Plate, K., Reif, O.-W., and Melzner, D. (2003) Membranes for protein isolation and purification, in *Isolation and Purification of Proteins* (eds R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson), Marcel Dekker, New York, pp. 191-223.

[١٢] Shuler, M.L. and Kargi, F. (2002) *Bioprocess Engineering. Basic Concepts*, 2nd edn, Prentice Hall, New Jersey.

[١٣] Save, S.V. and Pangarkar, V.G. (1995) Harvesting of *Saccharomyces cerevisiae* using colloidal gas aphrons. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **62,** 192-199.

[١٤] Hatti-Kaul, R. (2001) Aqueous two-phase systems: a general overview. *Mol. Biotechnol.*, **19,** 269-277.

[١٥] Harrison, S.T.L. (1991) Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnol. Adv.*, **9,** 217-240.

[١٦] Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. (2003) Release of protein from biological host, in *Isolation and Purification of Proteins* (eds R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson), Marcel Dekker, New York, pp. 1-27.

[١٧] Harrison, S.T.L., Dennis, J.S., and Chase, H.A. (1991) Combined chemical and mechanical processes for the disruption of bacteria. *Bioseparation*, **2,** 95-105.

[١٨] Freitag, R. and Horvath, C. (1995) Chromatography in the downstream processing of biotechnological products. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **53,** 17-59.

[١٩] Qureshi, N. and Blaschek, H.P. (2001) Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. *Renew. Energy*, **22,** 557-564.

[٢٠] Goldberg, K., Edegger, K., Kroutil, W., and Liese, A. (2006) Overcoming the thermo-dynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **95,** 192-198.

[٢١] Khayet, M. and Matsumara, T. (2004) Pervaporation and vacuum membrane distillation process: modeling and experiments. *AIChE J.*, **50,** 1697-1712.

[٢٢] El-Bourawi, M.S., Ding, Z., Ma, R., and Khayet, M. (2006) A framework for better understanding membrane distillation separation process. *J. Memb. Sci.*, **285,** 4-29.

[٢٣] Etschmann, M.M.W., Sell, D., and Schrader, J. (2005) Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethyacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysts with organo-philic pervaporation. *Biotechnol. Bioeng.*, **92,** 624-634.

[٢٤] King, C.J. (1996) Chemically assisted solvent extraction, in *Downstream Processing of Natural Products-A Practical Handbook* (ed. M. Verrall), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 93-103.

[٢٥] Randolp, T.W. (1990) Supercritical extractions in biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **8,** 78-82.

[٢٦] Ito, Y. and Bowman, R.L. (1970) Counter-current chromatography: liquid-liquid partition chromategraphy without solid support. *Science*, **167,** 281-283.

[٢٧] Schroen, C.G.P.H., Nierstrasz, V.A., Bosma, R., Kroon, P.J., Tjeerdsma, P.S., DeVroom, E., VanderLaan, J.M., Moody, H.M., Beeftink, H.H., Janssen, A.E.M., and Tramper, J. (2002) Integrated reactor concepts for the enzymatic synthesis of cephalexin. *Biotechnol. Bioeng.*, **80,** 144-155.

[٢٨] Schmidt, S., Havekost, D., Kaiser, K., Kauling, J., and Henzler, H.-J. (2005) Crystallization for the downstream processing of proteins. *Eng. Life Sci.*, **5,** 273-276.

[٢٩] Buque-Taboada, E.M., Straathof, A.J.J., Heijnen, J.J., and van der Wielen, L.A.M. (2004) *In situ* product removal using a crystalization loop in asymmetric reduction of 4-oxoisophorone by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **86,** 795-800.

[٣٠] Bayley, C.R. and Vaidya, N.A. (1992) *Chirality in Industry, The Commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds* (eds A.N. Collins, G.N. Sheldrake, and J. Crosby), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

[٣١] Tung, H.H., Waterson, S., Reynolds, S., and Paul, E. (1995) Resolution of ibuprofen via stereospecific crystallization. *AIChE Symp. Ser.*, **91,** 64-68.

[٣٢] Strancar, A., Podgornik, A., Barut, M., and Necina, R. (2002) Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **76,** 49-85.

[٣٣] Xie, S., Allington, R.W., Fréchet, J.M.J., and Svec, F. (2002) Porous polymer monoliths: an alternative to classical beads. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **76,** 87-125.

[٣٤] Mattiasson, B. (ed.) (1999) *Expanded Bed Chromatography*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

[٣٥] Imamoglu, S. (2002) Simulated moving bed chromatography (SMB) for application in bioseparation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **76,** 211-231.

[٣٦] Bechtold, M., Makart, S., Heinemann, M., and Panke, S. (2006) Integrated operation of continuous chromatography and biotrans-formations for the generic high yield production of fine chemicals. *J. Biotechnol.*, **124,** 146-162.

[٣٧] Wolfgang, J. and Prior, A. (2002) Continuous annular chromatography. *Adv. Biochem. Bioeng/ Biotechnol.*, **76,** 233-255.

[٣٨] Mosbach, K. and Ramström, O. (1996) The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio-technology*, **14,** 163-170.

[٣٩] Kempe, M. and Mosbach, K. (1995) Molecular imprinting used for chiral separations. *J. Chromatogr. A.*, **694,** 3-13.

[٤٠] Nicholls, I.A., Andersson, L.I., Mosbach, K., and Ekberg, B. (1995) Recognition and enantio-selection of drugs and biochemicals using molecular imprinted polymer technology. *Trends Biotechnol.*, **13,** 47-51.

[٤١] Ju, J.Y., Shin, C.S., Whitcombe, M.J., and Vulfson, E.N. (1999) Imprinted polymers as tools for the recovery of secondary metabolites produced by fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **64,** 232-239.

[٤٢] Kemmere, M.F. and Keurentjes, J.T.F. (2001) Membranes in chiral separations, in *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach* (ed. G. Subramanian), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 127-150.

[٤٣] Kwiatkowski, J.R., McAloon, A.J., Taylor, F., and Johnston, D.B. (2006) Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Ind. Crops Prod.*, **23,** 288-296.

[٤٤] Wasewar, K.L. and Pangarkar, V.G. (2006) Intensification of recovery of ethanol from fermentation broth using pervaporation: economical evaluation. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **20,** 135-145.

[٤٥] Ikegami, T., Kitamoto, D., Negishi, H., Haraya, K., Matsuda, H., Nianai, Y., Koura, N., Sano, T., and Yanagishita, H. (2003) Drastic improvement of bioethanol recovery using a pervaporation separation technique employing a silicone subber-coated silicalite membrane. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78,** 1006-1010.

[٤٦] Zeikus, J.G., Jain, M.K., and Elankovan, P. (1999) Biotechnology of succinic acid pro-duction and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51,** 545-552.

[٤٧] Datta, R. and Henry, M. (2006) Lactic acid: recent advances in products, process and technologies-a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81,** 1119-1129.

[٤٨] Joglekar, H.G., Rahman, I., Babu, S., Kulkarni, B.D., and Joshi, A. (2006) Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. *Sep. Purif. Technol.*, **52,** 1-17.

[٤٩] Song, H. and Lee, S.Y. (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, **39,** 352-361.

[٥٠] Baniel, A.M. and Eyal, A.M. (1995) Citric acid extraction. US Patent 5,426,220.

[٥١] Huh, Y.S., Jun, Y.-S., Hong, Y.K., Song, H., Lee, S.Y., and Hong, W.H. (2006) Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succinici-producens. Process Biochem.*, **41,** 1461-1465.

[٥٢] Bailly, M. (2002) Production of organic acids by bipolar electrodialysis: realizations and perspectives. *Desalination*, **144,** 157-162.

[٥٣] Glassner, D.A. and Datta, R. (1992) Process for the production and purification of succinic acid. US Patent 5,143,834.

[٥٤] Zeikus, J.G., Elankovan, P., and Grethlein, A. (1995) Utilizing fermentation as a processing alternative: succinic acid from renewable resources. *Chem. Proc.*, **1995,** 71-73.

[٥٥] Johnson, E.A. and Schroeder, W.A. (1996) *Microbial Carotenoids, Advances in Bio-chemical Engineering and Biotechnology*, vol. 53 (ed. A. Fiechter), Springer-Verlag, Heidel-berg, pp. 119-178.

[٥٦] Nobre, B., Marcelo, F., Passos, R., Beirão, L., Palavra, A., Gouveia, L., and Mendes, R. (2006) Supercritical carbon dioxide extraction of asta-xanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Eur. Food Res. Technol.*, **223,** 787-790.

[٥٧] Chen, F., Li, H.-B., Wong, R.N.-S., Ji, B., and Jiang, Y. (2005) Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the micro-alga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1064,** 183-186.

[٥٨] Mukherjee, S., Das, P., and Sen, R. (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.*, **24,** 509-515.

[٥٩] Steinbüchel, A. and Füchtenbush, B. (1998) Bacterial and other biological systems for poly-ester production. *Trends Biotechnol.*, **16,** 419-427.

[٦٠] Lee, S.Y. (1996) Bacterial polyhydroxy-alkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*, **49,** 1-14.

[٦١] Koning, G.J.M., Kellerhals, M., Meurs, C.V., and Witholt, B. (1997) A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from pseudomonads. Part 2: Process development and economic evaluation. *Bioprocess Eng.*, **17,** 15-21.

[٦٢] Tamer, I.M., Moo-Young, M., and Chisti, Y. (1998) Optimization of poly(β-hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus* : combined mechanical and chemical treatments. *Bioprocess Eng.*, **19,** 459-468.

[٦٣] Hahn, S.K., Chang, Y.K., and Lee, S.Y. (1995) Recovery and characterization of poly(3-hydroxy-butyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 34-39.

[٦٤] Choi, J. and Lee, S.Y. (1999) Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxy-butyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnol. Bioeng.*, **62,** 546-553.

[٦٥] Page, J.W. and Cornish, A. (1993) Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly-β-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59,** 4236-4244.

obeikandl.com

الفصل التاسع

التقنية الحيوية الصناعية في الصناعات الكيميائية والدوائية

INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY IN THE CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL INDUSTRIES

موريس فرانسن، مانفريد كيرشر، و رولاند وولجيموث

Maurice C.R. Franssen, Manfred Kircher, and Roland Wohlgemuth

(١ , ٩) المقدمة Introduction

لم تسهم المنتجات الصناعات الكيميائية والدوائية على المستوى الاقتصادي الصغير والكبير في وفورات التكاليف فحسب، ولكن أيضاً في التقدم الكبير في نوعية الحياة، والصحة اليومية، والتغذية، وحماية البيئة في الكثير من المناطق في جميع أنحاء العالم. تهدف المبادرات العالمية، على سبيل المثال برنامج الأمم المتحدة للبيئة، ومؤتمر القمة العالمي للتنمية المستدامة في جوهانسبرغ، وبرنامج إستراتيجية المنتج العالمية والرعاية المسؤولة للمجلس الدولي للرابطات الكيميائية (ICCA) إلى تقليل الآثار السلبية المهمة لاستخدام وإنتاج المواد الكيميائية على البيئة وصحة الإنسان.

تتطلب هذه الأهداف تحسينات مستمرة على مستويات عديدة، ولكن من الواضح أن طريقة التفاعل الأكثر انتقائية والانتقال من القياس المتكافئ للتفاعلات الحفزية سوف يكون لها تأثير أساسي وإيجابي. وتقلل تقنيات العمليات الحفزية كمية النفايات للكيلوجرام الواحد من المنتج بدلاً من التخليق العضوي الكلاسيكي الذي يتطلب كواشف مساعدة في كميات متكافئة، ويتم تحسين البيئة والصحة والسلامة من خلال تجنب استخدام المذيبات العضوية السامة. والتقليل من النفايات فيما يتعلق بالمنتج هو هدف كلٍ من الكيمياء الخضراء والتقنية الحيوية البيضاء/ الصناعية حيث تقود محفزات الطبيعة الطريق في تصاميم العمليات الصناعية. ولأن المحفزات الحيوية تحلل بسهولة وغير سامة، فإن الإجراءات ذات استخدام أدوات التحفيز الحيوية لم تجد طريقها إلى الإنتاج الصناعي على المستوى الكبير في الصناعات الكيميائية والدوائية فحسب، ولكنها أيضاً تجد تطبيقات متزايدة في مرحلة البحث والتطوير. وسوف تعطي نظرة عامة على بعض هذه العمليات في هذا الفصل.

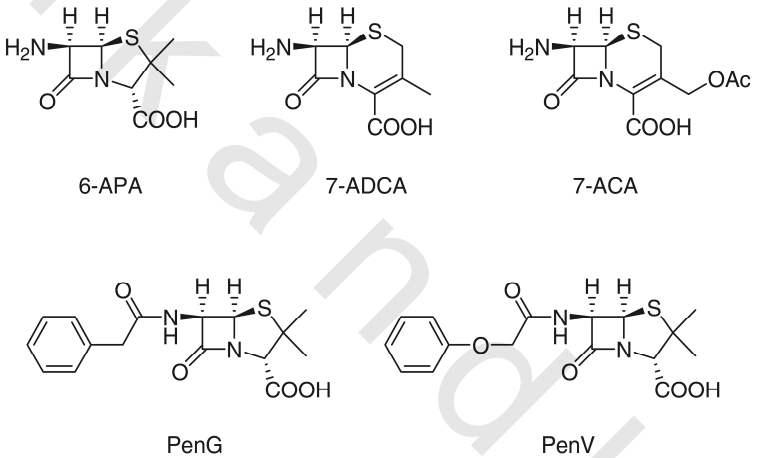
(٩,٢) عمليات الحفز الحيوية: وجهات النظر العلمية والتقنية

Biocatalytic Processes: Scientific and Technolohical Perspectives

(٩,٢,١) المضادات الحيوية البيتا-لاكتام Beta-Lactam Antibiotics

(٩,٢,١,١) النواة The Nucleus

المضادات الحيوية البيتا-لاكتام هي مركبات ثنائية الحلقة تنتج بواسطة فطريات من أجناس البنسليوم والسيفالوسبوريوم. هناك فئتين: البنسيلينات والسيفالوسبورينات (الشكل رقم ٩,١) حيث يكمن الفرق بين الاثنين في النواة: البنسيلين لديه نواة حمض ٦-أمينو البينسيللانيك (6-APA) في حين أن السيفالوسبورينات لديها نواة حمض ٧-أمينو السيفالوسبورانيك (7-ACA) أو حمض ٧-أمينو دي أسيتوكسي السيفالوسبورانيك (7-ADCA). وكان البنسيلين ج (PenG) والبنسيلين في (PenV) أول مضادات البيتا-لاكتام المتاحة تجارياً [١].



الشكل رقم (٩,١). تركيب بعض المضادات الحيوية البيتا-لاكتام وأنويتها. 6-APA، ٦-أمينو البينسيللانيك؛ 7-ADCA، حمض ٧-أمينو دي أسيتوكسي السيفالوسبورانيك؛ 7-ACA، أمينو السيفالوسبورانيك؛ PenG، البنسيلين ج؛ PenV، البنسيلين في.

مع ظهور زيادة مقاومة الميكروبات منذ أواخر خمسينيات القرن الماضي، أصبح البحث عن مشتقات نشطة حقيقةً. لأن النشاط يكمن في جزء البيتا-لاكتام، فقد كان لابد من إيجاد طريقة لاستبدال السلسلة الجانبية، وكان عزل نواة البيتا-لاكتام في ذلك الوقت خطوة لا مفر منها. وكيميائياً، فإن هذا هي مهمة هائلة لأنه على الرغم من أن كلاً من البيتا-لاكتام والارتباط بين السلسلة الجانبية والنواة هو روابط أميدية، إلا أن البيتا-لاكتام هي إلى حدٍ بعيد الأكثر نشاطاً بسبب توتر الحلقة. وفي شركة جست بروكاديس (الآن DSM لمضادات العدوى، دلفت، هولندا)، تم تطوير عملية كيميائية ذات أربع خطوات للانقسام الانتقائي للسلسلة الجانبية للبنسيلين ج، والتي تشمل خطوة حماية-نزع الحماية، والاستخدام المكثف للمواد الكيميائية الخطرة مثل خماسي كلوريد الفوسفات، والتبريد لدرجات

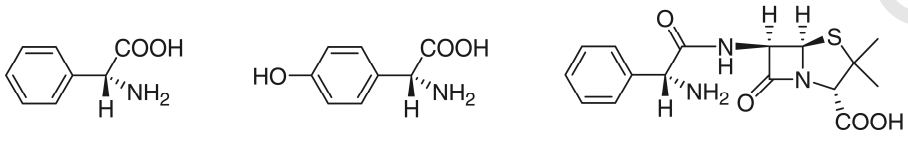
حرارة منخفضة. وعلى الرغم من كونه تحفة كيميائية، فإن العبء البيئي لهذه العملية كان كبيراً؛ بسبب النفايات السامة والمذيبات وارتفاع تكاليف الطاقة. وليس من المستغرب بعد ذلك أن يبدأ البحث عن عملية إنزيمية انتقائية.

في بدايات ستينيات القرن الماضي (عام ١٩٦٠م) أعلنت أربع شركات (باير، وبيتشام، وبريستول، وفايزر) كلٍ على حدة اكتشاف إنزيم قد يقسم البنسيلين ج إلى 6-APA وحمض فينيل الخليك. واستغرق الأمر بعض الوقت قبل أن تصبح هذه العملية قادرة على المنافسة، ولكن سادت عملية التحفيز الحيوي منذ اللحظة التي جاءت فيها الإنزيمات القوية والمقيدة في السوق. تستخدم معظم الشركات البنسيلين أسيليز من إشيريشيا القولون. ويصل السوق العالمي للـ 6-APA الآن إلى ٣٥٠٠٠ طن في العام. وأهم ميزة لهذه العملية هي الفعالية البيئية.

تنعم السيفالوسبورينات بأهمية متزايدة؛ لأن لديها نشاط مضاد للجراثيم أقوى، وخاصةً ضد السلالات المقاومة للبنسيلين. وعلاوةً على ذلك، يمكن تحملها بصورةٍ أفضل من قبل الأشخاص الذين لديهم حساسية للبنسيلين. وكان تغيير السلسلة الجانبية ضرورياً؛ بسبب النشاط الحيوي المنخفض للمنتجات الفطرية الأساسية. تختلف السلاسل الجانبية في السيفالوسبورينات عن تلك في البنسيلينات (عادةً مشتقات حمض الأديبيك) وليست إزالتها عادية. لذلك، تم تطوير طرق توسيع الحلقة الكيميائية من البنسيلين، والبنسيلين ج بشكلٍ رئيس، متبوعةً بالإزالة الكيميائية أو الإنزيمية المعروفة للسلسلة الجانبية لإعطاء 7-ADCA و7-ACA. ولدي شركة DSM الآن عملية تخمير مباشرة للسيفالوسبورينات تعتمد على البنسيليوم كريوزجينوم المعدل وراثياً، يعقبها تحلل لسلسلة الأديبيك الجانبية بواسطة الأسيليز لتعطي 7-ADCA. وأكبر مزايا هذه العملية هو تكاليف الإنتاج المنخفضة إلى حدٍ كبير وخفض استعمال الكواشف والمذيبات (انظر المرجع [٢] لتاريخ هذه العملية).

(٢, ١, ٢, ٩) السلاسل الجانبية The Side-Chains

تم تطوير طائفة واسعة من السلاسل الجانبية للمضادات الحيوية البيتا-لاكتام على مدى الأعوام، وهي كثيرة جداً لذكرها هنا. أهمها (الشكل رقم ٢, ٩) هي دي-فينيل جليسين (D-PG) ودي-هيدروكسي فينيل جليسين (D-HPG). يعطي الجدول رقم (١, ٩) نظرة عامة على المنتجات وأسواقها.



D-PG D-HPG Ampicillin

الشكل رقم (٢, ٩). سلاسل جانبية مهمة للمضادات الحيوية البيتا-لاكتام شبه المخلقة وتركيب مثل هذه المضادات الحيوية D-PG، دي-فينيل جليسين؛ D-HPG، دي-هيدروكسي فينيل جليسين.

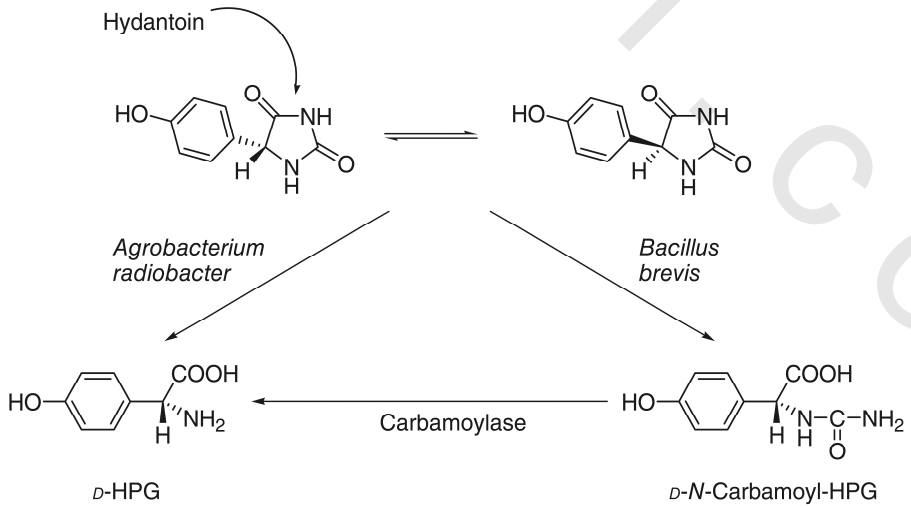
الجدول رقم (١ , ٩). بعض المضادات الحيوية شبه المخلقة وأسواقها.

السلسلة الجانبية	النواة	اسم المنتج	التقديم إلى السوق	السوق العالمي التقريبي (طن/ عام، ٢٠٠٦م)
د–فينيل جليسين	6-APA	أمبيسلين	١٩٦١م	٥٠٠٠
	7-ADCA	سيفاليكسين	١٩٧٠م	٤٠٠٠
د–هيدروكسي فينيل جليسين	6-APA	أموكسيسيلين	١٩٧٢م	١٦٠٠٠
	7-ADCA	سيفادروكسيل	١٩٧٧م	١٠٠٠

6-APA، ٦–أمينو البينسللانيك؛ 7-ADCA، حمض ٧–أمينو دي أسيتوكسي السيفالوسبورانيك.

تؤدي السلاسل الجانبية PG وHPG فقط إلى مضادات حيوية نشطة عندما يقترن متشابه الـ –دي النقي بنواة البيتا–لاكتام. والتخلق الكيميائي للراسيمات يكون عديم الأهمية، ولكن يجب فصل المتشابهات الفراغية الفردية. وقد تم ذلك من خلال البلورة ثنائية المتشابهات، وهو ما يعني أن الحمض الفراغي (مثل حمض الكامفوركبريتيك) يضاف إلى الراسيمات، مشكلاً أملاح ثنائية المتشابهات، والتي يتبلور منها واحد فقط. ولا تزال هذه هي العملية المسيطرة على إنتاج الـ D–PG [٢]، على الرغم من وجود العمليات الإنزيمية [٣].

من ناحية أخرى، يتم فقط إنتاج الـ D-HPG بواسطة عملية إنزيمية عن طريق الهيدانتوين (المخطط رقم ١ , ٩) [٢]. ولعملية الهيدانتوين ميزة أن وسط التفاعل يتراسم تلقائياً تحت ظروف التفاعل، متجنبةً الترسيم الكيميائي للمتشابهات غير المرغوب فيها، مما يؤدي إلى كفاءة إنتاج أعلى بكثير وجودة منتج محسنة.

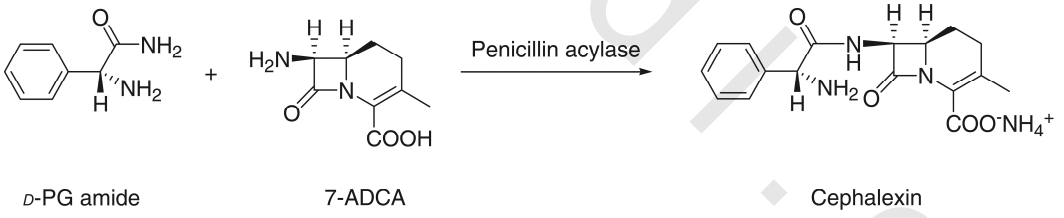


المخطط رقم (١ , ٩). عملية الهيدانتوين لإنتاج دي–هيدروكسي فينيل جليسين.

في البداية سوقت شركتين عملية الهيدانتوين للـ D-HPG تجارياً: شركة كانيجافوشي اليابانية (الآن كانيجا) وشركة ريكورداتي الإيطالية. وفي الطريقة اليابانية يتم فقط كسر رابطة كربون–نيتروجين واحدة بواسطة الهيدانتوينيز في الباسيلس بريفيس، مما يعني أنه يجب إزالة جزء اليوريا المتبقي بخطوة إنزيمية أخرى. ويقسم الكائن الدقيق ريكورداتي كلاً من الرابطتين، لذلك فهذه هي عملية أحادية الخطوة. ومؤخراً، أدخلت شركة كاديكا أيضاً إنزيم دي–كاربامويليز في عملياتها.

(٣, ١, ٢, ٩) التخليق نصف الإنزيمي Enzymatic Semi-Synthesis

تم تصنيع مضادات حيوية بيتا–لاكتام جديدة عن طريق إضافة سلاسل جانبية جديدة لبيئة تخمير الفطر، وكان لهذا نجاحاً محدوداً؛ بسبب امتصاص الفطريات الانتقائي لهذه المركبات. وتم تطوير عمليتين للاقتران الكيميائي بين السلسلة الجانبية والنواة، وكلاهما يعاني من عيوب مثل التبريد العميق (طريقة ملح داين) والمواد الكيميائية النشطة (طريقة ملح داين وأنهيدريد داين). وأدت البحوث الأخيرة، بدايةً في شركة نوفو، الدنمارك، والتي أكملتها شركة DSM وجامعات دلفت، وجرونينجن، ونيميجن، وفاجينينجين في هولندا إلى تطوير عملية اقتران إنزيمية، باستخدام نفس البنسيلين أسيليز أو شبيه له كما يتم استخدامه في إزالة السلسلة الجانبية في المضادات الحيوية البيتا–لاكتام الفطرية (انظر المخطط رقم ٢, ٩). لأسباب الديناميكية الحرارية، يستخدم أميد الـ D-(H)PG بدلاً من الحمض الحر.



المخطط رقم (٢, ٩). التكوين الإنزيمي للمضادات البيتا–لاكتام الحيوية شبه المخلقة.

تم افتتاح مصنع لإنتاج السيفالكسين اعتماداً على هذا التفاعل بواسطة شركة Chemferm DSM في برشلونة (أسبانيا) في أواخر تسعينيات القرن الماضي. والعملية الجديدة لها مزايا بيئية واضحة فضلاً عن تحسين جودة وثبات المنتج [٤]. وبشكلٍ عام ومقارنةً مع الطرق الكيميائية التقليدية، فقد أدى الجمع بين التخمير المباشر وتركيب الـ 7-ADCA مع استبدال سلسلة التحفيز الحيوي الجانبية إلى تحسينات تصل إلى ٥٠٪ أو أكثر في العوامل المهمة مثل تكوين النفايات الصلبة والانبعاثات في الهواء واحتياجات الطاقة، والسمية، والمخاطر المحتملة واستهلاك الكواشف والمذيبات [٤، ٥].

(٩,٢,٢) وحدات البناء الفراغية Chiral Building Blocks

أظهرت مجموعة من دراسات الحالة أن تخليق التحفيز الحيوي غير المتماثل للعديد من وحدات البناء المهمة ليس ناجحاً فقط على مستوى البحث ولكن يمكنه أيضاً أن ينافس بنجاح على نطاقٍ صناعي مع الأساليب الكيميائية الرياضية الكلاسيكية [٦، ٧]. وإنتاج التحفيز الحيوي باستخدام الإنزيمات المحللة ثابت على الصعيد العالمي، ويجري في شركة سيجما-الدريتش أكثر من ١٠٠ تفاعل تحفيز حيوي بشكلٍ روتيني على النطاق الصناعي. وكان تطوير وزيادة المستوى لأنواع التفاعلات الإنزيمية الأخرى، مثل تفاعلات الأكسدة ذو أهمية كبيرة، لأن الأكسدة الكيميائية باستخدام مزيج من المؤكسدات النشطة والمذيبات القابلة للاشتعال تعدُّ عائقاً كبيراً على مستوى الإنتاج.

تم توطيد أول أكسدة تحفيز حيوية على المستوى الصناعي، باير-فيليجر [٨-١٠] والتي استبدلت المؤكسدات الكلاسيكية بالهواء والمذيبات القابلة للاشتعال بالماء. وهذا لم يقلل فقط مخاطر سلامة تفاعل الأكسدة الكلاسيكي ولكنه أيضاً يعني أنه يمكن القيام به بطريقة عالية التخصصية التجسيمية، مما يتيح الوصول إلى اللاكتونات الفراغية المفيدة كمواد صيدلانية وسيطة. ولا تكمن مزايا طرق إنتاج التحفيز الحيوي فقط في طريقة تصنيع المنتج ولكن أيضاً في المعرفة المكتسبة عن الطرق غير المختارة. وبالتالي يتم إنشاء شبكة من الجسور بين التفاعلات الكيميائية الرياضية، والحفزية، والحفزية الحيوية التي يمكن استناداً عليها تأسيس إنتاجيات جديدة [١١].

(٩,٢,٣) وحدات البناء للبوليمرات Building Blocks for Polymers

معظم وحدات بناء البوليمرات هي مواد كيميائية، مما يعني أنها تنتج في حجمٍ كبير جداً. وتعدُّ تكاليف الإنتاج وخصائص المنتج هي العوامل الأساسية. وهذه هي منطقة صعبة الاختراق بالنسبة للتقنية الحيوية الصناعية، ليس فقط بسبب الحجم الكبير (يجب إنتاج كميات كبيرة من الإنزيمات أو الخلايا) ولكن أيضاً لأن تكاليف التطوير يجب أن تسترد وتكون هوامش الربح صغيرة في الكيماويات الضخمة. ومع ذلك تم تسجيل بعض النجاحات الملحوظة خلال العقدين الماضيين.

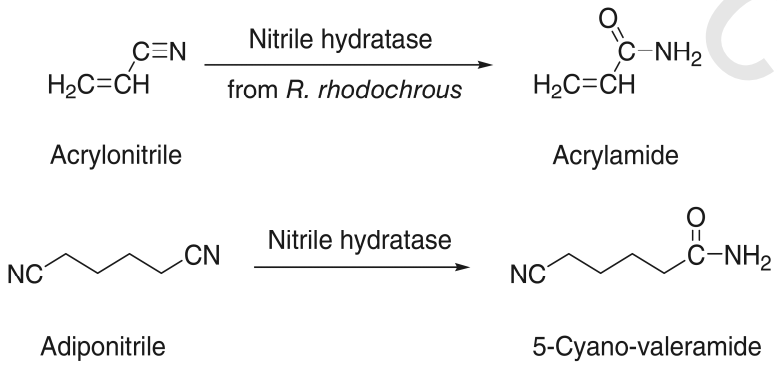
الأكريلاميد هو وحدة بناء البولي أكريلاميد، والذي يستخدم على نطاقٍ واسع في المختبر للفصل اللوني والكهربائي أو على شكل مثخن ذائب في الماء في معالجة مياه الصرف الصحي وصناعة الورق. ويصنع المونومر عن طريق إضافة جزيء واحد من الماء إلى الأكريلونيتريل، والذي يصنع بدوره من البروبين المشتق من النفتا والأمونيا. وكان يتم تحويل الأكريلونيتريل إلى الأكريلاميد لعقودٍ عديدة باستخدام محفز قائم على النحاس عند ٨٠-١٤٠ درجة مئوية. وعلى الرغم من كون العملية فعالة، إلا أنها تنتج مياه صرف صحي سامة تحتوي على

النحاس وسيانيد الهيدروجين. وتؤدي درجة الحرارة العالية المستخدمة إلى بلمرة غير مرغوب فيها للأكريلاميد مما يجعل من الضروري تنقية المنتج.

في سبعينيات القرن الماضي، تم العثور في مختبر البروفيسور هيدياكي يامادا في كيوتو (اليابان) على بعض الكائنات الدقيقة التي كانت قادرة على النمو على الأكريلونيتريل. وهي تحلل وسط التفاعل لمادة الأكريلاميد، وبعد ذلك إلى حمض الأكريليك، والذي تستخدمه بعد ذلك. بعد تحسين السلالة وسبر تسلسل الجين للإنزيم المحلل الثاني، تم الحصول على كائنات حية دقيقة يمكنها تحويل الأكريلونيتريل لمادة الأكريلاميد انتقائياً (انظر المخطط رقم ٩,٣). واستخدمت سلالة البسودوموناس كلورافيس في البداية، ولكن في وقتٍ لاحق أصبحت سلالة الرودوكوكس رودوكروس هي المقياس. والعملية تجري في درجة حرارة أقل بكثيرٍ من العملية الكيميائية (صفر-١٥٠ درجة)، متجنبةً البلمرة العفوية والتنقية فيما بعد. والعامل الأخير يبدو أنه هو عامل النجاح من الناحية الاقتصادية. فكلٍ من وسط الفاعل والمنتج مركبات نشطة ولكن المستخلص حر الخلايا يتحمل ما يصل إلى ٥٠٠ جم/ لتر من وسط التفاعل عند التقييد في البولي أكريلاميد (منتجه المبلمر).

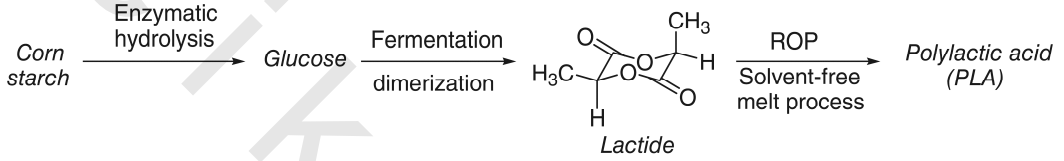
وتم تسويق العملية الإنزيمية في البداية من قبل شركة كيماويات نيتو (وهي الآن جزء من ميتسوبيشي رايون) ولكنها في الوقت الحاضر تجرى في الكثير من الشركات في جميع أنحاء العالم، بما في ذلك SNF (فرنسا) وإيفونيك للصناعات (ألمانيا)، في حجم إنتاج عالمي أكثر من ٢٥٠٠٠٠ طن في العام.

وتم تسويق عملية مرتبطة عن طريق شركة دوبونت. في هذه الحالة، يحول النيتريل هيدراتيز واحدة من مجموعات النيتريل من الأديبونيتريل، منتجاً ٥-سيانو فاليراميد (انظر المخطط رقم ٩,٣)، والذي هو المادة البادئة لتخليق المبيد العشبي أزافينيدين. وتجرى العملية على نطاق عديد الأطنان. والميزة الأساسية لهذه العملية هي انتقائيتها: فالتفاعل ينتج أحادي الأميد مع انتقائية قدرها ٩٦٪ عند نسبة تحويل ٩٧٪ [١٢-١٥].



المخطط رقم (٩,٣). استخدام النيتريل هيدراتيز لإنتاج المواد الكيميائية الأساسية.

وقد وحدت شركتي كارجيل وداو للكيماويات جهودهما لتسويق اكتشافهما عن إمكانية إنتاج حمض البولي لاكتيك، بوليمر ذو إمكانيات تجارية كبرى، باستخدام التقنية الحيوية الصناعية. وتظهر العملية في المخطط رقم (٩,٤). في الخطوة الأولى، يتم تحليل نشا الذرة بإنزيمات الجلوكوأميليز والبوليولانيز لإنتاج شراب الجلوكوز، والتي هي ربما أكبر، وأقدم وأعرق تقنية حيوية صناعية على الأرض! ويتم بعد ذلك تخمير الجلوكوز لاهوائياً بواسطة الكائنات الدقيقة المحسنة إلى حمض إل-لاكتيك، والذي يتحد مع جزيء آخر كيميائياً إلى الاكتيد (انظر المخطط رقم ٩,٤). ويتم أيضاً الحصول على جزء ضئيل من حمض اللاكتيك ، مما يؤدي إلى بعضٍ من دي-إل-لاكتيد، والذي لابد من إزالته عن طريق التقطير. وتتم بلمرة اللاكتيد كيميائياً.



المخطط رقم (٩,٤). عملية كارجيل-داو لحمض البولي لاكتيك.

وحمض البولي لاكتيك (PLA) له خصائص مماثلة لتلك التي للبولي ايثلين والبولي بروبلين. فهو أقل مقاومةً للحرارة ولكنه أكثر قابلية للتحلل الحيوي. ولدى شركة أعمال الطبيعة المشتركة (تملكها حالياً كارجيل) مصنع لإنتاج PLA في بلير (نبراسكا) منذ عام ٢٠٠٢م، مع قدرة إنتاج ١٤٠٠٠٠ طن سنوياً (الشكل رقم ٩,٣).



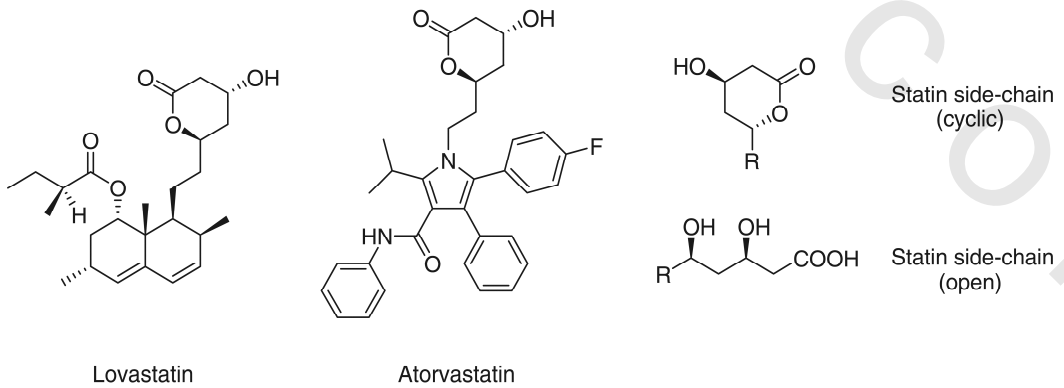
الشكل رقم (٩,٣). مصنع شركة أعمال الطبيعة، بلير، نبراسكا، الولايات المتحدة الأمريكية.

تنتج دوبونت لبنة بناء أخرى للمواد البلاستيكية وهي ١،٣-بروباندیول من الجلوكوز في عملية تخمير. وتم تحسين الكائن الدقيق على النحو الأمثل باستخدام هندسة المسار. ويعطي اقتران ١،٣-بروباندیول مع حمض التيرفثاليك بوليمر يدعى Sorona™، والذي يغزل إلى ألياف. ويستخدم حالياً في الملابس والسجاد، حيث إنه يحظى بتقدير لنعومته المحسنة، وقابليته للصبغ، وتمدده. وتكلفة تصنيع الـ ١،٣-بروباندیول المنتج عن طريق التخمير منخفضة عن الذي ينتج بالعمليات الكيميائية المنافسة، ويستخدم مواد خام متجددة [١٦].

وحتى الآن تتم عملية البلمرة كيميائياً، إلا أن الأبحاث على البلمرة الإنزيمية مازالت مستمرة. وأظهرت أبحاث مجموعات جروس [١٧] وهيس [١٨] أن الليبيزات، خاصة الليبيز المقيد B (Novozym 435) من الكانديدا أنتاركتيكا هو محفز ممتاز لبلمرة اللاكتونات. كما تم ذكر البلمرة انتقائية المتشابهات مع الثبات داخل الخلايا [١٩].

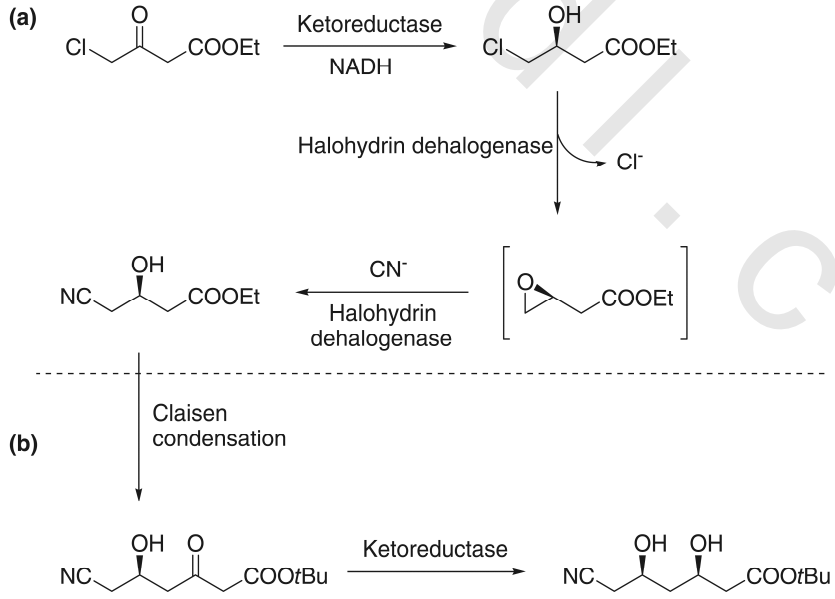
(٤ , ٢ , ٩) الكيماويات الدقيقة: الستاتينات Fine Chemicals: Statins

إن ارتفاع مستوى الكولسترول هو مصدر قلق متزايد على صحة الإنسان وليس من العجب أن دواءً مخفضاً للكولسترول مثل أتورفاستاتين (ليبيتور، الشكل رقم ٤ ,٩) هو أفضل دواء بيعٍ في الوقت الحالي في جميع أنحاء العالم [٦]. الستاتينات هي مثبطات لإنزيم HMG-CoA ريداكتيز، وهو إنزيم ضروري في التخليق الحيوي للكولسترول. وهي تتكون من لبٍ من عدة حلقات والتي يمكن أنيلتها (على سبيل المثال، لوفاستاتين) أو استبدالها مع حلقاتٍ أخرى (على سبيل المثال، أتورفاستاتين. في جميع الحالات هناك حمض بيتا-هيدروكسي نقي المتشابهات وظيفي مرتبط باللب كسلسلة جانبية. وبسبب السوق الضخمة المحتملة للستاتينات، فقد قامت الكثير من الشركات المختلفة بتسويق الطرق لإنتاج سلاسل جانبية نقية المتشابهات تجارياً.



الشكل رقم (٤ ,٩). نوعين مهمين من الستاتينات وسلاسلها الجانبية.

وقد طورت شركة كوديكسيس عملية لإعداد المركز الفراغي الأول في سلسلة الستاتين الجانبية. ويمكن إدخال المركز الثاني بسهولةٍ عن طريق الحث غير المتماثل باستخدام المركز الفراغي الأول. وتتكون عملية كوديكسيس من سلسلة إنزيمية ذات خطوتين (المخطط رقم ٥, ٩أ). في الخطوة الأولى، يحدث الاختزال الانتقائي للمجسمات واتجاه التفاعل للإستر الإيثيلي لحمض ٤-كلورو-٣-كيتوكابرويك بإنزيم الكيتوريداكتيز من الكانديدا ماجنوليا، المستنسخة في إيشيريشيا القولون [٢٠]. ويتم إعادة تدوير العامل المساعد NADH باستخدام الجلوكوز ديهيدروجينيز المحسن. ويجب تحسين الكيتوريداكتيز وراثياً من أجل تلبية الخصائص المطلوبة: تحمل وسط التفاعل لأكثر من ١٥٠ جم/لتر، ونسبة وسط التفاعل/الإنزيم >١٠٠، وزيادة المتشابهات لأكثر من ٥, ٩٩٪، تردد تحول العامل المساعد أعلى من ٢٠٠٠٠ وزمن تفاعل أقل من عشر ساعات. في الخطوة الثانية، يتم استخدام إنزيم الهالوهيدرين ديهالوجينيز المعبر في إيشيريشيا القولون لتكوين إيبوكسيد وبعد ذلك فتحه باستخدام أيون السيانيد. وهذا الإنزيم ليس محفزاً جيداً للأسينة، لذلك تم تحسينه باستخدام التطور الموجه. وكانت المعايير الواجب توافرها في هذه الحالة: تحويل كامل لـ ١٠٠ جم/لتر على الأقل، وإنتاجية حجمية >٢٠ (جم منتج/لتر.ساعة.جم إنزيم)، وطريقة عزل بسيطة للمنتج وعملية صياغة بسيطة للإنزيم. وقد أمكن في نهاية المطاف الحصول على إنزيم ذو ٣٧ طفرة وله إنتاجية حجمية محسنة بحوالي ٤٠٠٠ ضعف [٢١]. وتجري العملية برمتها الآن على نطاق المتر المكعب، وتنتج أطنان من المنتج.

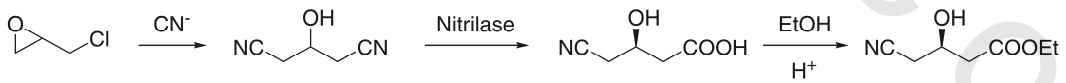


المخطط رقم (٥, ٩). عمليات شركة كوديكسيس لسلسلة الستاتين الجانبية.

إن الميزة الأساسية لتفاعل الأسينة الإنزيمي هو أن التفاعل نظيف وتتكون نواتج ثانوية ليس من الصعب التخلص منها. وتسبب النواتج النموذجية في الأسينة الكيميائية للهيدروكسي نيتريلات تدهوراً في المنتج إذا لم يتم اتخاذ احتياطات خاصة [٢٢]. وقد فازت عملية كوديكسيس بجائزة الكيمياء الخضراء الرئاسية في عام ٢٠٠٦م.

مؤخراً، تم إدخال المركز الفراغي الثاني للسلسلة الجانبية للستاتين عن طريق التحفيز الحيوي باستخدام كيتوريداكتيز آخر (المخطط رقم ٩,٥ب). تم تخليق وتحسين عدة جينات لإنزيم الكيتوريداكتيز باستخدام التطور الموجه. وقد وجدت زيادة قدرها ٢٠ ضعفاً في النشاط بعد خمسة محاولات، ولكن هذا لا يزال غير جيد بما فيه الكفاية. وباستخدام نموذج مبني على التراكيب القائمة، تم تشييد مكتبة اندماجية للجينات شبه المخلقة ذات طفرات في الموقع النشط. وأسفر هذا عن إنزيم قادر على العمل في تركيزات من وسط التفاعل أعلى من ٣٠٠ جم/ لتر عند تحميل منخفض للإنزيم، معطياً نسبة تحويل ٩٩,٣٪ وزيادة في ثنائية المتشابهات > ٩٩,٩٪. ومتابعة العمل سهلة وتحتاج العملية إلى مذيبات عضوية أقل بكثير من العملية الكيميائية (٣,٢ مقابل ٢٢,٢١ لتر/ كجم). وتجرى العملية الآن على نطاق المتر المكعب في الهند.

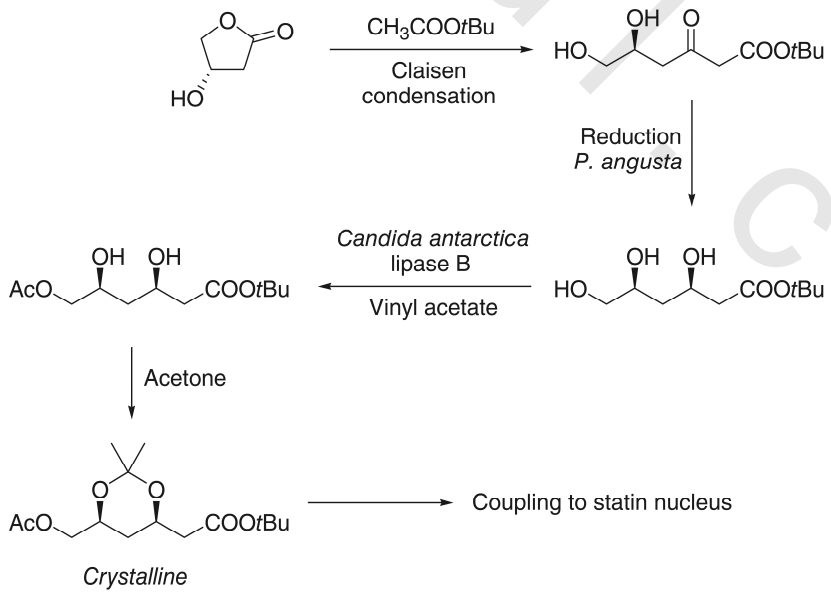
وقد أسست شركة ديفيرسا طريقة ناجحة لنفس وحدة البناء للستاتين مثل التي انتجت في البداية بواسطة شركة كوديكسيس (المخطط رقم ٩,٦). يبدأ نهجها من إيبيكلوروهيدرين الراسمي، والذي يعطي عند معاملته بفائض من السيانيد الداي نيتريل قبل الفراغي. ويعطي التحلل المائي الانتقائي بواسطة إنزيم نيتريليز والأسترة اللاحقة حمض (ر)-٤-سيانو-٣-هيدروكسي-البيوتانويك نقي المتشابهات [٢٣، ٢٤]. وتم تحسين النيتريليز باستخدام التطور الموجه ويحول وسط التفاعل كلياً عند تركيزات أكبر من ٣٦٠ جم/ لتر [٢٥]. والميزة الرئيسة لهذه العملية هي التكلفة المنخفضة للمادة البادئة إيبيكلوروهيدرين، والتي تكلف فقط ٢ يورو/ كجم. وكان الدافع الآخر لهذه العملية هو توافر مجموعة كبيرة من إنزيمات النيتريليزات في شركة ديفيرسا، وأحدها كان مناسباً بشكلٍ مثالي لهذا التطبيق.



المخطط رقم (٩,٦). عملية شركة ديفيرسا للسلسلة الجانبية للستاتين.

وقد تم تطوير منتج مماثل (بالكلوريد بدلاً من السيانيد) بواسطة شركة كانيكا منذ عام ٢٠٠١م ويتم عن طريق الإختزال الإنزيمي للكيتون المناظر. ومع ذلك، فإن هذا النهج يتطلب أن تستخدم كيمياء الأسينة الصعبة في وقتٍ متأخر من مخطط التخليق.

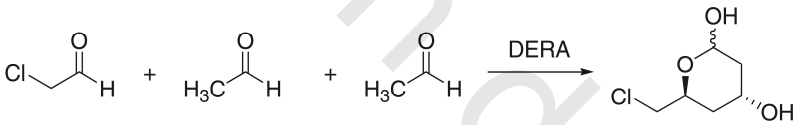
وتماماً مثل شركة كوديكسيس، طورت شركة أفيسيا (الآن NPIL الصيدلية) أيضاً عملية باستخدام الكيتوريداكتيز (المخطط رقم ٩,٧). والمادة البادئة هي (إس)-٣-هيدروكسي بيوتيرولاكتون نقي المتشابهات، والذي يتوفر تجارياً. ويقترن هذا المركب في وقتٍ لاحق بثلاثي-بيوتيل الأسيتات بواسطة تكثيف كلايزين. ويتم اختزال المنتج بعد ذلك انتقائياً مجسماً باستخدام الكيتوريداكتيز من البيشيا أنجوستا، معطياً تحويل > ٩٦٪، وزيادة ثنائية المتشابهات >٩٩٪، وزيادة المتشابهات >٩٩٪ [٢٦]. وتم تطوير العملية للتريول الفراغي من ١ جم إلى ١ طن في أقل من عام. وينتج هذا المركب بواسطة شركة NPIL الصيدلية على مستوى ٧٠٠٠٠ لتر، معطياً أطنان من المنتج سنوياً. ولاقتران نواة الستاتين، لابد من القيام ببعض كيمياء وقاية المجموعات. يجب حماية مجموعات الهيدروكسيل الثانوية لتسهيل الاقتران الانتقائي لمجموعة الهيدروكسيل الأولية إلى النواة. ومع ذلك، تؤدي الحماية بواسطة الأسيتون إلى الأسيتونويد الخطأ، وعليه يجب حجب مجموعة الهيدروكسيل الأولية بالفعل الانتقائي لاتجاه التفاعل لإنزيم الليبيز (الليبيز ب للكانديدا أنتاركتيكا) وخلات الفينيل. هذا التفاعل سريع (< ٥ ساعات للتحويل الكامل) وعالي الانتقائية لاتجاه التفاعل. وتعطي المعاملة اللاحقة بالأسيتون السلسلة الجانبية المحمية بشكلٍ مناسب. وليس من الضروري إعادة تدوير الإنزيمات المستخدمة؛ نظراً لأنها رخيصة بما فيه الكفاية. والمزايا الرئيسة لهذه الطريقة هي الحماية عالية الانتقائية للمجسمات للغاية للاختزال بواسطة البيشيا أنجوستا، والحماية عالية الانتقائية لاتجاه التفاعل للتريول والطبيعة البلورية لأسيتونويد الاسيتيل التي تسمح بالتنقية عن طريق التبلور.



المخطط رقم (٩,٧). عملية شركة أفيسيا للسلسلة الجانبية للستاتين.

وشرعت شركة DSM في طريقة تعتمد على الألدوليزات. وقد أوضح البروفيسور تشي-هوي وونج (سكريبس، سان دييجو، الولايات المتحدة الأمريكية) أن إنزيم ألدوليز ٢-ديؤكسي ريبوز-٥-فوسفات (DERA) يكون قادراً على أن يقرن ثلاثة ألدهيدات على التوالي وبطريقة عالية الانتقائية للمجسمات. وتكون الانتقائية في كل خطوة أقل من ٩٨٪، ولكن لايتم قبول المكونات المجسمة الطفيفة كوسط للتفاعل في تفاعل الألدول الثاني، مما يؤدي إلى زيادة مرتفعة في ثنائية المتشابهات بشكلٍ استثنائي [٤٥]. ومن أجل تكوين سلسلة الستاتين الجانبية، يجب أن يقترن جزيئين من الأسيتالديهيد بجزيء واحد من كلورو أسيتالديهيد (المخطط رقم ٩,٨). وهذا يطرح مشكلة إذ إن الكلورو أسيتالديهيد يثبط الإنزيم الأصلي عند التركيزات المستخدمة صناعياً. وأدت الطفرات العشوائية للـ DERA إلى مكتبة من ١٠٠٠٠ مستنسخ والتي تم فحصها باستخدام GC-MS-MS لمقاومة الكلورو أسيتالديهيد وتكوين المنتج النهائي. وتم تحليل أفضل الطفرات، وأثبت توليف الطفرات كونه مفيداً. وفي النهاية، تم الحصول على طفرة مزدوجة والتي تم تفعيلها حتى بواسطة الكلورو أسيتالديهيد.

والعملية لديها ميزة تكوين مركزين فراغيين في خطوة واحدة من مادة غير فراغية رخيصة جداً، مما أدى إلى ١٠٠٪ إنتاجية/ ١٠٠٪ زيادة المتشابهات نظرياً. والحقيقة أن شركة DSM لها موقف قوي في مجال الألدوليزات كان عاملاً رئيساً في تطوير هذه العملية، والتي تم توسيع نطاقها إلى المستوى الصناعي.



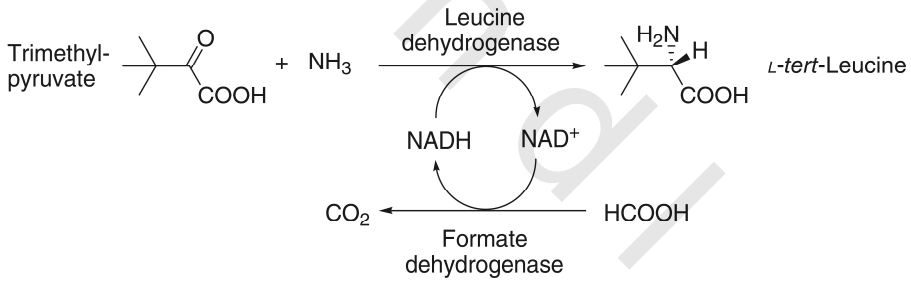
المخطط رقم (٩,٨). عملية شركة DSM للسلسلة الجانبية للستاتين.

(٩,٢,٥) الأحماض الأمينية Amino Acids

الأحماض الأمينية هي منتجات في غاية الأهمية في مختلف فروع الصناعة، وخاصةً في مجال صناعة المواد الغذائية والنكهات. وإل-جلوتامات هو محسن للطعم مهم جداً (الإنتاج العالمي هو ١,٧ مليون طن سنوياً) [٦]، إل-فينيل ألانين هو الوحدة البنائية لمادة التحلية الصناعية الأسبارتام (١٠٠٠٠ طن سنوياً في عام ٢٠٠٤م) [٢٨]، حمض إل-أسبارتيك هو مادة تعطي الطعم اللاذع ووحدة بنائية للأسبارتام (١٧٠٠٠ طن سنوياً في عام ٢٠٠٤م) [www.ajinomoto.com]، ويستخدم إل-ليسين يستخدم للغذاء والأعلاف (٧٠٠٠٠٠ طن سنوياً في عام ٢٠٠٤م) [٢٨]. وتوجد لبعض الأحماض الأمينية عمليات تخمير (على سبيل المثال، حمض إل-أسبارتيك)، وللبعض الآخر توجد عمليات تعتمد عل الفصل الإنزيمي الحركي (على سبيل المثال، إل-فينيل ألانين) أو التخليق الإنزيمي غير المتماثل (حمض إل-أسبارتيك). وتتم عملية تحويل داخلي مثيرة للاهتمام في شركة تانابي في اليابان، حيث يتحول حمض إل-أسبارتيك إلى إل-ألانين بواسطة أسبارتات-بيتا-كربوكسيليز.

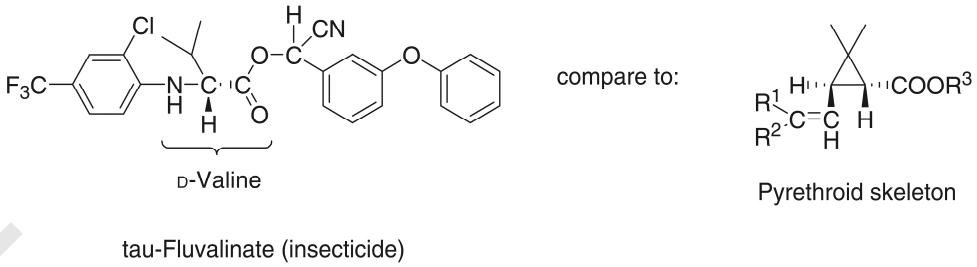
وتكون الأحماض الأمينية مثل دي-فينيل جليسين ودي-بارا-هيدروكسي فينيل جليسين مهمة جداً لصناعة الأدوية، كما نوقش في وقتٍ سابق في هذا الفصل. وعلى الرغم من كونهما من أصغر الأحماض الأمينية إلا أنه لا يزال إل-ثلاثي-ليوسين و دي-فالين مثيرين للاهتمام.

إل-ثلاثي-ليوسين هو حمض أميني غير طبيعي يستخدم كرابط فراغي في متراكبات عناصر المرحلة الانتقالية لتفاعلات الاختزال التحفيزي في صناعة الأدوية. وحجم السوق أقل من ١٠ طن في السنة ويستخدم المركب للمنتجات عالية القيمة. ونقاء المنتج هو العامل الرئيس، مما يسمح بعملية إبداعية والتي وضعتها شركة إيفونيك (المخطط رقم ٩,٩). وتستند العملية على أمينة اختزالية لثلاثي ميثيل البيروفات بواسطة إنزيم ليسين ديهيدروجينيز في وجود الأمونيا وNADH، معطياً إل-ثلاثي-ليوسين نقي المتشايهات في عائد كمي. يتم تدوير العامل المساعد NADH بواسطة إنزيم الفورمات ديهيدروجينيز، باستخدام حمض الفورميك كمانح للإلكترون معطياً ثاني أكسيد الكربون غير الضار كناتج ثانوي. ويقترن NADH بالبولي إيثيلين جلايكول من أجل استخدامه داخل مفاعل غشاء الترشيح الفائق. وتم الحصول على عائد وقتي وأرقام مبيعات تقدر بـ١٢٥٠٠٠ [٢٨].



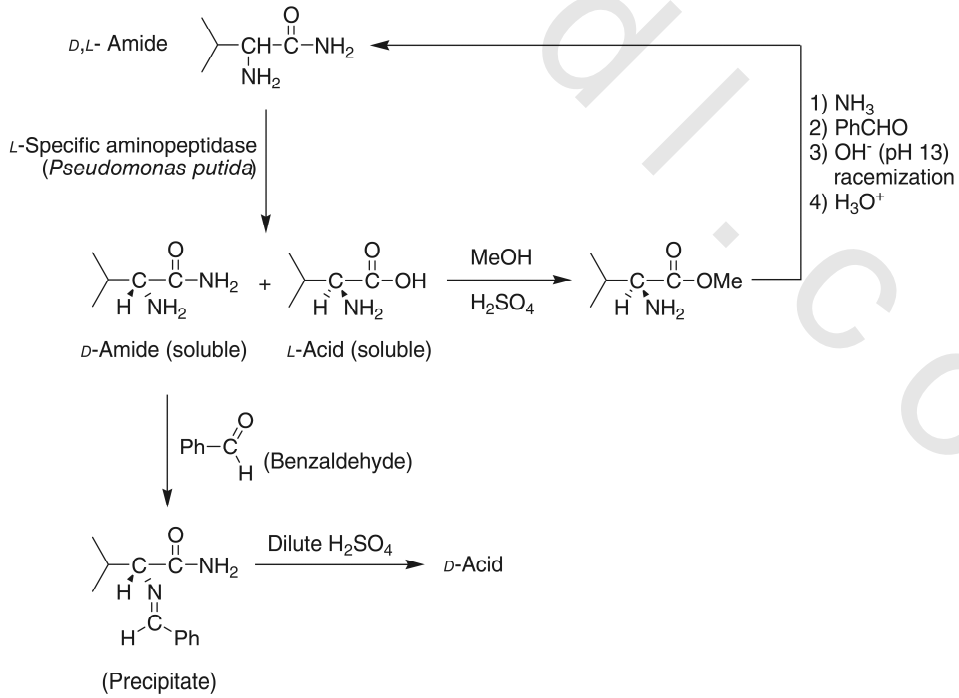
المخطط رقم (٩,٩). عملية إل-ثلاثي الليوسين لشركة إيفونيك.

الـ دي-فالين هو مكون من تاو-فلوفالينات ومبيد للحشرات من فئة البيريثرويدات (الشكل رقم ٩,٥) [٢٩]. والبيريثرين هو منتج طبيعي يتواجد في أزهار الاقحوان. ويمكن نزع سمية البيريثرين الطبيعي بسهولة نسبياً بالإنزيمات داخل الحشرات، لذلك تم تخليق متغايرات صناعية أكثر ثباتاً (البيريثرويدات). وبالإضافة إلى ذلك، فهي أكثر فعالية وأقل سمية للثدييات من البيريثرين الطبيعي. التاو-فلوفالينات من أهم البيروثرويدات. وهو يحتوي على وحدتي بناء فراغيتين، دي-فالين وسيانوهيدرين فراغي، ولكن يتم تسويقها كخليط من المتشابهات الثنائية، مع تثبيت الكيمياء الفراغية فقط في جزء الحمض الأميني [٢٩].



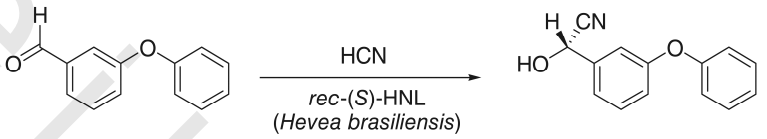
الشكل رقم (٥ ,٩). تركيبات التاو-فلوفالينات والبيريثرويدات.

وتم إنتاج دي-فالين من قبل شركة DSM باستخدام، على سبيل المثال تقنية الأميديز أو الهيدانتوينيز الخاصة بها. والمخطط العام لعملية الأميداز معطى في المخطط رقم (١٠ ,٩) [٣]. يتم فصل الأميد الراسمي المخلق كيميائياً بواسطة إنزيم الأمينوببتيديز الخاص للصورة إل- من البسودوموناس بوتيدا [٣٠]. ويتم ترسيب الأميد غير المتفاعل كقاعدة شيف له، في حين أن ناتج الحمض إل- يمكن ترسيمه وإعادة تحويله إلى الأميد إذا اقتضت اقتصاديات العملية. وإنزيم الأمينوببتيديز هذا هو متنوع للغاية؛ لأنه يقبل مجموعة متنوعة من السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية. ومع ذلك، يجب أن يكون هناك ذرة الهيدروجين في ذرة الكربون الألفا. وتم تطوير إنزيمات أمينوأميديز من المايكوباكتريوم نيوأورام [٣١] والأميديز من الأوكروباكتروم أنثروبي [٣٢، ٣٣] بواسطة شركة DSM وذلك لأوساط التفاعل الأكثر تقيداً.



المخطط رقم (١٠ ,٩). عملية DSM للأحماض الأمينية أحادية المتشابهات.

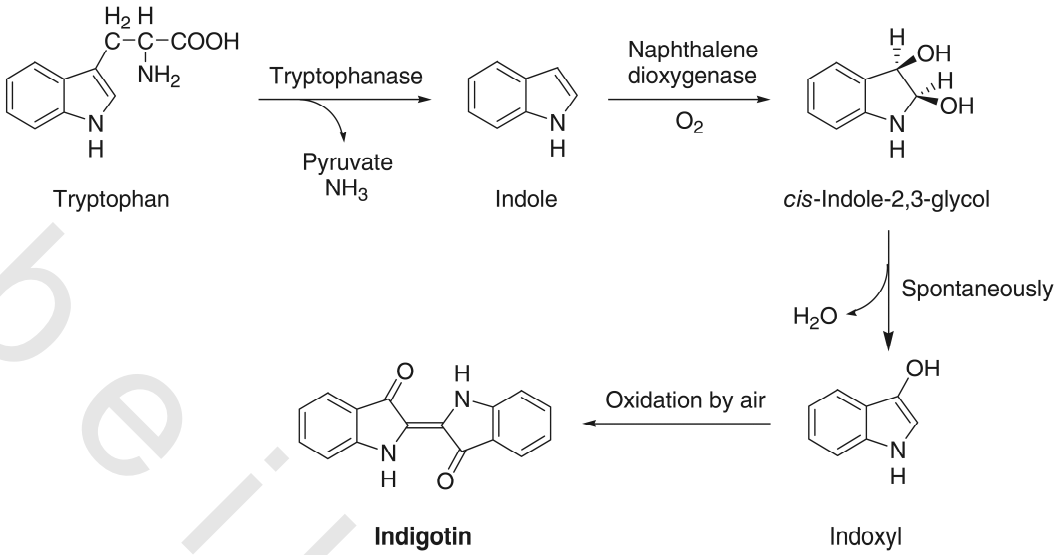
ويمكن أيضاً تخليق وحدة البناء الفراغية الثانية في صورة نقية المتشابهات بواسطة التحفيز الحيوي، على سبيل المثال، في شركة DSM ES/IM في لينز، النمسا (المخطط رقم ٩,١١). يكون الإنزيم المستخدم هو إس-هيدروكسي نيتريل ليز من الهيفيا برازيلينسيس (شجرة المطاط) المستنسخ والمعبر بافراط في خميرة البيشيا باستوريس. ويقبل هذا الإنزيم المتنوع كلاً من وسائط التفاعل الأليفاتية والأروماتية بتركيزات مولارية. ويمكن تخليق المتشابهة الأخرى باستخدام إنزيم آر-هيدروكسي نيتريل ليز من اللوز (برونوس أميجدالاس). والميزة الأساسية هي أنه يتم التخليق غير المتماثل، أي أن العائد النظري هو ١٠٠٪.



المخطط رقم (٩,١١). عملية DSM لإس سيانوهايدرينات.

(٩,٢,٦) الإنديجوتين Indigotin

لا تعد كل عملية تقنية حيوية نجاحاً، حتى عندما تكون الفوائد واضحة، على سبيل المثال العبء البيئي المنخفض. وافتراضياً هناك المزيد من هذه الحالات، ولكن الإنديجوتين على الأقل هو أفضل حالة موثقة. الإنديجوتين هو مركب أزرق كثيف معروف لصباغة قماش الدنيم (صبغة اللون النيلي) التي أصبحت عنصراً أساسياً من نمط حياة مجموعات كبيرة من الناس في العالم الغربي. والإنتاج حوالي ٨٠٠٠٠ طن في السنة. وكان الإنديجوتين أصلاً مركباً طبيعياً مستمداً من النباتات "كاللون النيلي الصحيح" (إنديجوفيرا تينكتوريا) والنيلج (إيساتيس تينكتوريا) [www.answers.com/topic/indigo-3008]. يعتمد الإنتاج الصناعي منذ اكتشافه في أوائل القرن العشرين على تسلسل كيميائي رباعي الخطوات (ما يدعى بعملية هويمان)، بدءاً من حمض الأنثرانيليك الذي يتم الحصول عليه بأكسدة محفزة بالزئبق للنفثالين المشتق من الوقود الحفريات. وتتضمن العملية أيضاً نترات البنزين السامة للاستخلاص والمحتمل تسببها للسرطان. وعن طريق الصدفة، وجد الباحثون في شركة أمجين إنتاج الإنديجوتين عندما أدخلوا جينات أكسدة النفثالين إلى إيشيريشيا القولون. وكان هدفهم هو بناء مسار لحمض الساليسيليك (الوحدة البنائية للأسبرين). ومع ذلك، يبدو أن إيشيريشيا القولون تنتج الإندول عند نموها على الجلوكوز من تكسير التربتوفان (المخطط رقم ٩,١٢). يتأكسد الإندول بواسطة الإنزيم الجديد نفثالين دي أوكسيجينيز إلى إندوكسيل الذي يتحد ثنائياً بالأكسدة عند التعرض للهواء ليعطي الإنديجوتين.



المخطط رقم (١٢, ٩). عملية أمجين للإنديجوتين.

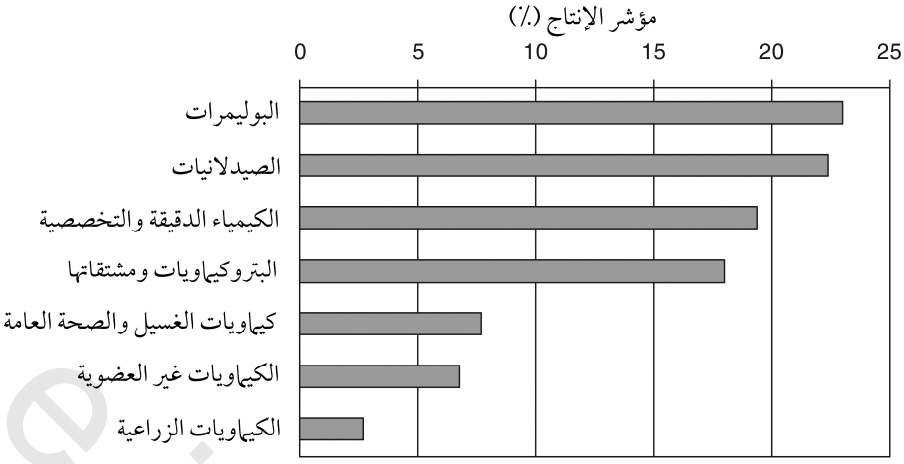
على الرغم من أن مستوى الإنتاج الأصلي كان فقط حوالي ٢٥ ملجم/ لتر في اليوم، فقد تم تحسينه بقوة بواسطة العلماء في أمجين. ومع ذلك، فقد هذه العملية الجميلة اعتبرت ذات قدرة تنافسية عالية من قبل الصناعة الكيميائية المنتجة للإنديجوتين وقرروا تخفيض سعر الإنديجوتين بشدة من أجل إخراج المنتج الجديد من السوق. وكانوا قادرين على فعل ذلك؛ لأن نباتات الإنديجوتين انخفضت قيمتها تماماً، بحيث إنه وجب فقط تغطية تكاليف التشغيل [٣٤].لم تكن أمجين (والتي باعت عمليتها إلى إيستمان كوداك) قادرة على استرداد الاستثمارات وتم التخلي عن العملية. وتمتلك شركة جينيكور الآن حقوق العملية التقنية ولاتزال تعمل على ذلك، ولكن حتى الآن لا يوجد مصنع تقني حيوي واسع المستوى للإنديجوتين.

وقد نشر مؤخراً التركيب البلوري لإنزيم النفثالين دي أوكسيجينيز [٣٥]. ويبدو أن له تخصصية واسعة لأوساط التفاعل مرتبطة بانتقائية مجسمات جيدة، ومما لاشك فيه أنه سيؤدي إلى مزيدٍ من البحوث لتطبيق هذا الإنزيم.

(٩,٣) عمليات التحفيز الحيوي: السوق والمنظور التجاري

Biocatalytic Processes: Business and Commercial Perspective

تنتج حالياً الصناعة الكيميائية ٢٧ مليون طن من المواد الكيميائية العضوية مثل البوليمرات والمواد الصيدلانية والكيماويات الدقيقة والمتخصصة، وأكثر من ذلك لجميع شرائح حياتنا اليومية بقيمة ٢٠٠٠ مليار يورو في جميع أنحاء العالم (الشكل رقم ٩,٦). ويتم إنتاج معظم المنتجات عن طريق التخليق الكيميائي بدءاً من وحدات البناء الكيميائية البسيطة كتلك المنتجة من النفط الحفري [٢٧].



الشكل رقم (٦ ,٩). مؤشر إنتاج الصناعات الكيميائية (ألمانيا).

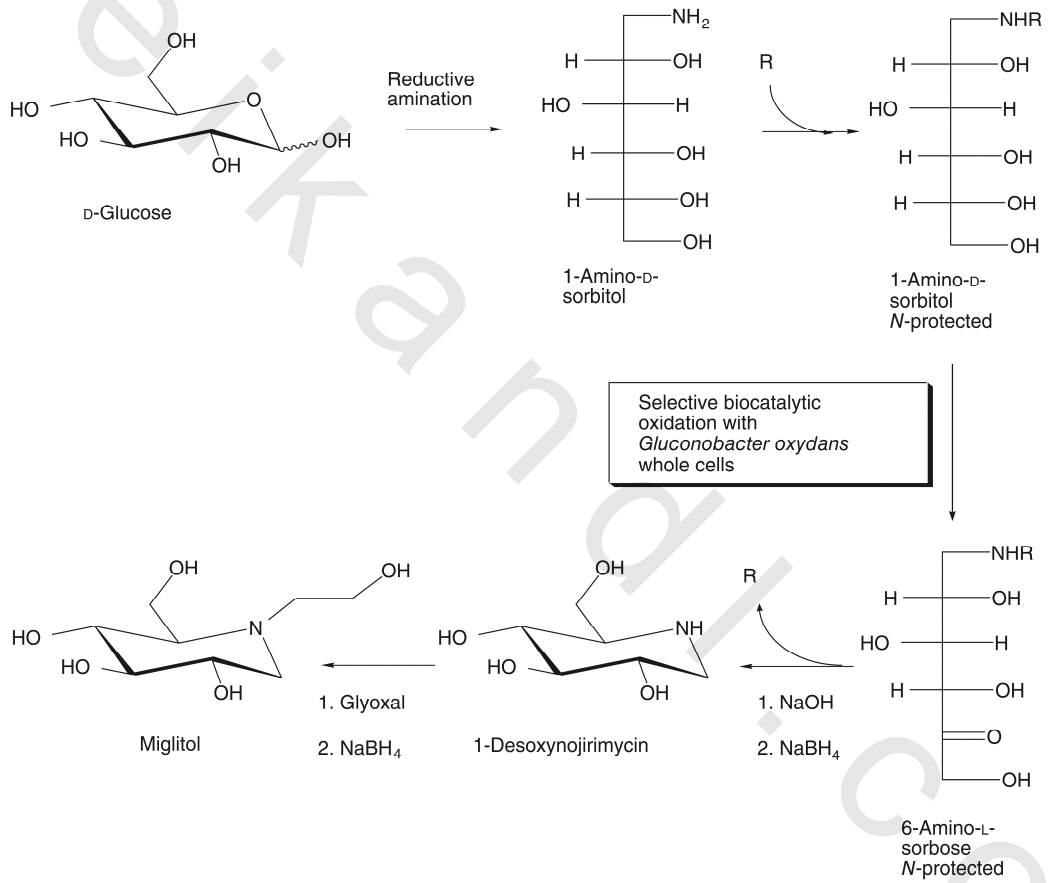
وقد كانت التقنية الحيوية الصناعية راسخة في الصناعة الكيميائية لعقود. ومع ذلك، فإنها تساهم فقط بـ ٥٠ مليار يورو أو ٢٪ من حجم مبيعات الصناعة الكيميائية البالغ ٢٠٠٠ مليار يورو، خاصةً في القطاعات الثلاثة، الأدوية، والكيمياء الدقيقة والمتخصصة وكذلك منتجات المنظفات والنظافة الشخصية. والسكر المستخرج مباشرةً من الكتلة الحيوية الزراعية مثل قصب السكر أو بنجر السكر أو المنتج عن طريق التحليل الإنزيمي من نشا الذرة هو المصدر الكربوني المهيمن.

من أمثلة المنتجات النموذجية الأحماض الأمينية مثل إل-ليسين، وإل-ثريونين، وإل-تربتوفان المنتجة عن طريق التخمير أو الأحماض الأمينية الدي وكذلك المشتقات مثل إل-ثلاثي-ليسين المتوفر عن طريق التخليق الكيميائي المزدوج مع التحفيز الإنزيمي (ريكسيم، فرنسا). وتشمل أمثلة الشركات المتخصصة في الطرق الإنزيمية للمركبات نقية المتشابهات تشمل كوديكسيس وباير للرعاية الصحية. ومن الضروري لهذه التطبيقات أن تجمع بين التركيب الكيميائي مع العملية الحيوية كما على سبيل المثال، في إنتاج المكون الدوائي الفعال الميجليتول، وهو مثبط لإنزيمات ألفا-جلوكوسيديزات الفعال لعلاج مرض السكري عن طريق الفم (المخطط رقم ١٣ ,٩).

والمواد المذابة المتوافقة هي مجموعة من الجزيئات الواقية المخلقة بالبكتيريا المحبة للملوحة، ويتم إنتاجها بواسطة تحفيز الخلايا الكاملة في شركة بيتوب، ألمانيا. والأكثر صلة هي الإيكتوين والهيدروكسي إيكتوين، ويتم تسويق كلاً منهما كمكون وظيفي لتطبيقات العناية بالبشرة (المخطط رقم ١٤ ,٩).

أطلقت شركة براين الحيوية بألمانيا، منتجاً جديداً لتنشيط للعناية بالبشرة لتنشيط الجلد يحتوي على مثبط الأنسجة المؤتلف ٢-ميتالوبروتينيز. ويعتمد نجاح السوق لهذه المنتجات غالباً على وظيفتها كوحدة بناء دوائية

عالية التخصصية أو كعامل لمستحضرات التجميل مع وظيفة غذائية أو طبية حيوية. وتكون القيمة في الوظيفة. وهذا النوع من القيمة هو ما يبحث عنه المستثمرون. ويعد خروج الممول لشركة يوليش للكيماويات الدقيقة إلى شركة كوديكسيس هو فقط واحد من الأمثلة الكثيرة. وتوجد أمثلة كثيرة في المجال الدوائي الحيوي وأيضاً في أسواق الطب الحيوي، ومستحضرات التجميل، والتغذية؛ على سبيل المثال تطور شركة سينوميكس منتجات وظيفية لسوق إضافات الطعام. وغالباً يكون حجم سوق المنتجات الوظيفية من هذا النوع محدوداً ولا تكون تكاليف الإنتاج لنجاح السوق.



المخطط رقم (١٣, ٩). عملية مزدوجة تخليقية/ حفزية حيوية للميجليتول.



المخطط رقم (١٤, ٩). المواد المذابة المتوافقة الإيكتوين (يسار) وهيدروكسي إيكتوين (يمين).

obeikandl.com

ومع ذلك، فإن المنتجات الضخمة تكون أيضاً راسخة، مثل الأحماض الأمينية المضافة للأعلاف (> مليون طن سنوياً؛ شركة إيفونيك، وADM، وأجينوموتو)، والفيتامينات (DSM)، وإنزيمات المنظفات (نوفوزايمس، وهنكل). يتم إنتاج جميع هذه المنتجات بواسطة عمليات التقنية الحيوية الصناعية؛ لأنها توفر الاختيار التقني الوحيد. ولا توفر الكيمياء المشتقة من المواد البادئة القائمة على البترول طرق كبيرة المستوى لإنتاج جزيئات نقية المتشابهات أو الأحماض الأمينية المعقدة. ومع ذلك، إذا كان هناك طريق كيميائي متاح أو يمكن تطويره في فترة زمنية قصيرة فإن الجداول الزمنية في الصناعة الكيميائية تميل لصالح التخليق الكيميائي بسبب المعرفة الكبيرة للتفاعل والمكتسبة على مدى السنوات والقدرة على التنبؤ بالوقت اللازم لكل خطوة تخليقية.

وهناك، مع ذلك عدد من المنتجات التي ليست سهلة التحضير من المواد الأولية المتاحة عموماً أو أن طرق التفاعل المتاحة عموماً ليست انتقائية بما فيه الكفاية. وهنا في تلك الحالات وجدت عمليات التحفيز الحيوي مكانها في الصناعة الكيميائية وتستفيد الكثير من الشركات من المحفزات الحيوية في مجال الكيماويات الدقيقة والمتخصصة.

بجانب حقيقة أن الصناعة هي بشكلٍ عام أكثر دراية بالتخليق الكيميائي ويتوفر لها مصانع إنتاج منخفضة التكاليف، فإن هناك سبباً بسيطاً لانتشار التخليق الكيميائي: فحتى الآن لا تضاهي المواد الأولية المرتبطة بالكيمياء، والزيوت المعدنية مصدر الكربون؛ وذلك لكونها أرخص من مصادر الكربون الحيوية المفضلة المتجددة.

إن تكلفة الكربون هي أمر حاسم لتكلفة إنتاج الكثير من المواد الكيميائية: في عام ٢٠٠٤م –عند سعر نفط أقل من ٥٠ دولار/ البرميل– تراوحت تكلفة المنتج الهيدروكربوني الخاصة بين ٤٢٪ (البوليسترين)، ٤٩٪ (راتنج PET)، و٧٩٪ (مطاط البيوتادين). وكلما تمت مقارنة التخليق الكيميائي والتقنية الحيوية الصناعية من وجهة نظر تقنية فإن تكاليف المواد الخام من الكربون يكون حاسمة، ولكن قد تجعل الجوانب الاجتماعية الاقتصادية مثل قبول المنتج من قبل العملاء، والظروف البيئية وتغيير ظروف الحدود الاقتصادية المصادر الحيوية المتجددة أكثر قدرة على المنافسة.

ومع ذلك، فإن تكلفة مصادر الكربون تتغير ببطء على مدى السنوات ولكن بشكلٍ كبير في الأشهر الأخيرة. وقد تزايدت تكلفة النفط لمستويات غير متوقعة. فمنذ عام ٢٠٠٤م سجلت الأسواق زيادة قدرها ٥٠٪. وكان لارتفاع تكلفة النفط تأثير خطير على القدرة التنافسية لمصادر الكربون الحيوية المتجددة: في عام ١٩٩٨م كانت التكلفة لكل برميل من الزيت المعدني ١٧ دولاراً أمريكياً مقابل ٨٨ دولاراً لزيت فول الصويا، وتغيرت العلاقة اليوم إلى ٧٢ دولاراً أمريكياً مقابل ٧٨ دولاراً أمريكياً، مبينة أن النفط الحفري فقد ميزة التكلفة التقليدية.

مع كون المواد الأولية الحيوية المتجددة قادرة على المنافسة، تكتسب تقنيات معالجتها أهمية جديدة أيضاً. فلم تعد التقنية الحيوية تقتصر على المنتجات حيث تكون وسيلة الإنتاج الوحيدة. ويتم تحديد القرار لعمليات التقنية

الحيوية من قبل مصدر الكربون الأكثر تنافسية. وإذا كان مصدر كربوني قائم على نبات زراعي، فإن التقنية الحيوية تكون هي العملية المفضلة.

وتفضل هـذه البيئة الاقتصادية المتغيرة بالفعل المنتجات الجديدة والعمليات الجديدة. وحمض البولي لاكتيك لشركة كارجيل هو مثال لبوليمر جديد يعتمد على المواد الأولية الحيوية المتجددة. ويتم إنتاج حمض اللاكتيك عن طريق التخمير المعتمد على السكر وكذلك على البلمرة بالعمليات الكيميائية. قـد يمثل الجمع بين خطوات التقنية الحيوية والعملية الكيميائية النموذج لمستقبل الصناعة الكيميائية. وقـد استثمرت كارجيل بالفعل فـي مصنع ينتج ١٤٠٠٠٠ طن في العام. منذ عام ٢٠٠٤م أنتجت إيفونيك العامل المضاد لكشف تسلسل الجين إيثيل ثلاثي-بيوتيل الأثير بسعة ٢٥٠٠٠٠ طن سنوياً باستخـدام الإيثانول الحيوي كمـادة أولية. وتنـتج دوبونت للبوليمرات الهندسية البروبان ديول الحيوي كمادة بادئة لـ Sorona وغيرها من البوليمرات المهجنة.

وتعد هذه أمثلة مبكرة عندما أدت عمليات التقنية الحيوية إلى منتجات بديلة لنظرائها من البتروكيماويات. ومعظم أكثر العمليات في خط الإنتاج. وعلى النقيض من المنتجات المذكورة أعلاه، فإن وظيفية المونومرات مثل حمض اللاكتيك أو من المنتجات مثل البروبان ديول وETBE منخفضة إلى حدٍ ما. ويعتمد نجاحها في السوق على تكلفة الإنتاج ويكون عامل التنافسية الحاسم هو كفاءة تكلفة العملية. من وجهة نظر المستثمر قد لا ينظر إلى العملية على أنها تستحق الاستثمار فيها. ومع ذلك، قد يتغير هذا الموقف عندما يدرك المستثمرون حجم السوق الهائل لبدائل التقنية الحيوية لمنتجات البتروكيماويات التقليدية.

ومن ناحية أخرى، قد يستغرق إقناع المستثمرين في مجال التقنية الحيوية التقليدية وقتاً طويلاً؛ لأن نموذج العمل يختلف هنا عن النموذج الأول: نحن نتحدث الآن عن منتجات منخفضة القيمة لأسواق كبيرة الحجم. سوف يزيد اهتمام المستثمرين عندما يدرك العالم المالي شخصية منصة التقنية الحيوية. يتم إنتاج جميع الوسائط الأساسية للصناعة الكيميائية مثل حامض اللاكتيك، و١،٣-بروبان ديول، وحمض السكسينيك، وحمض ٣-هيدروكسي بروبيونيك، وإن-بيوتانول، وحمض إيتاكونيك، والبروبيلين جليكول، والإيزوسوربيد، وحمض الليفيولينيك بواسطة مسارات الأيض الغذائي الأولي الميكروبي. وقد يكون تحسين مسار واحد لأغراض صناعية مكلفاً بالنسبة للمنتج الأول، ولكن متى تم ترسيخه في الصناعة الكيميائية فقد يقدم نفس المسار بعد تعديلات قليلة فقط منتج آخر عالي الحجم، وهكذا. وعليه تكتسب نظم الإنتاج الحيوية للعمليات ذات كفاءة التكلفة للمركبات الصناعية البسيطة قيمة هائلة. وسوف يسحب هذا المزيج رأس المال إلى التقنية الحيوية الصناعية، مما يسرع في تطوير عمليات التقنية الحيوية للصناعات الكيماوية.

(٩ , ٤) السلامة والصحة والمنظور البيئي Safety, Health and Environmental Perspective

مع تزايد عدد السكان في هذا العالم، فإن الأنشطة الصناعية سوف تكون قريبة من الأماكن التي يسكنها البشر وهذا أمر لا مفر منه. ويصبح الناس بذلك أكثر عرضة لقضايا السلامة والصحة المرتبطة بأنشطة الإنتاج الصناعي هذه. ويتم تحديد قضايا السلامة والصحة عن طريق سمية وثبات المواد الكيميائية، والمواد المساعدة، والمواد الوسيطة، والمنتجات، والنواتج الثانوية. بالإضافة إلى ذلك، يجب أن يؤخذ الثبات المحدود وحدود تحمل الخطأ لبعض التفاعلات في الاعتبار. وتقدم العمليات الحيوية مساهمةً مهمة في تقليل النفايات الأساسية، وتحسينات السلامة والصحة والطاقة من خلال استخدام محفزات الطبيعة، وبالتالي تجنب المواد الكيميائية شديدة التفاعل وغير الانتقائية [٣٦].

وفي الواجهة البيئية، تم استخدام التحفيز الحيوي والتحويل الحيوي لتحويل المنتجات الثانوية السامة والنفايات إلى مواد متوافقة بيئياً [٣٧]، ولكن هناك حاجة ملحة لدمج الجوانب البيئية في طرق التخليق. وقد تم البدء في دمج أدوات تحفيز حيوية انتقائية وقابلة لتطوير المستوى في تخطيط الطرق التخليقية من المواد البادئة إلى المنتج وهي تعد مفتاح النمو الاقتصادي العالمي المستدام مع إضافة بيئة [٣٨]. إن حل القضايا البيئية ليس مهماً في المحاليل الناتجة في نهاية خطوط الإنتاج فحسب، ولكن أيضاً في تجنب النفايات وتقليلها من خلال التفاعلات الانتقائية وتجنب مخططات الحماية-نزع الحماية المعقدة ذات التفاعلات الجانبية. وبالتالي يتم ترجمة التصميم والتنفيذ العملي للتفاعلات عالية الإنتاجية ومنخفضة النفايات على المستوى البيئي الدقيق إلى تحسينات هائلة على المستوى البيئي الكبير.

(٩ , ٥) التوقعات Outlook

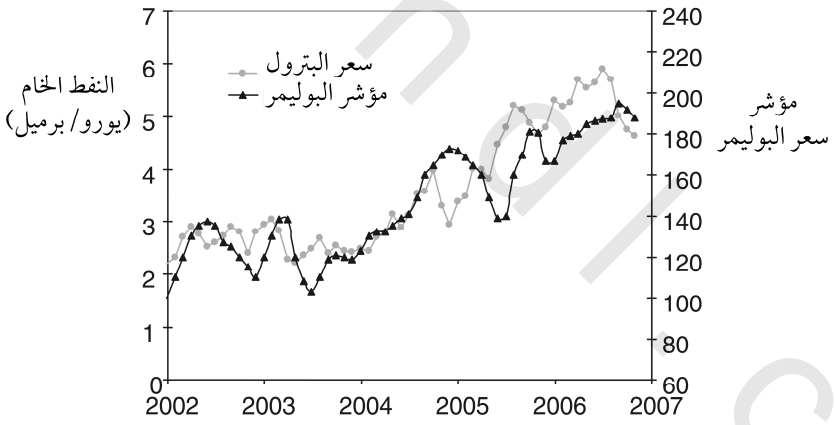
تمدنا التقنية الحيوية الصناعية بالكيمياويات، والمواد، والوقود، والأدوية على نحوٍ مستدام. وذكرت في هذا الفصل عدة عمليات ناجحة على المستوى الكبير والصغير، وينبغي التأكيد على أن هذه أمثلة فقط. فقائمة العمليات المعطاة ليست بأي حالٍ من الأحوال حصرية، وهناك الكثير من التطبيقات الأخرى، وخاصة في الكيماويات الدقيقة والمتخصصة. تؤدي التقنية الحيوية دوراً مهماً في هذه القطاعات بسبب صرامة قضايا النقاء، وبالتالي يتم استغلال انتقائية الإنزيمات المعروفة بالكامل. وبالإضافة إلى ذلك، تكون قيمة هذه المنتجات في وظيفتها، على سبيل المثال في حالة وحدة بناء دوائية في الارتباط الخاص بمستقبل أو في حالة إنزيم محفز في تفاعله الخاص.

بالنظر في سلسلة القيمة -بدءاً من المواد الخام إلى الوسائط إلى منتج المستهلك- فإن المنتجات الوظيفية تكون في أعلى السلسلة. وتعتمد قيمة هذه الجزيئات على مساهمتها في أداء المنتج النهائي أكثر منه على تكلفة الإنتاج

(COGS؛ تكلفة السلع والخدمات). ولذلك فإن هوامش الربح في هذا القطاع أعلى مما هي في القطاعات الأخرى، مما يسمح باسترجاع تكاليف تطوير المحفزات الحيوية (المحسنة) على الرغم من أن حجم إنتاج الكيماويات المتخصصة قد يكون فقط بضعة أطنان سنوياً. والمثال على منتج ذو سوق وحجم الإنتاج محدود هو إل-ثلاثي الليسين بواسطة شركة إيفونيك.

وقد اخترقت أيضاً التقنية الحيوية الصناعية قطاع البوليمرات والمواد بنجاح. ويعد حمض البولي لاكتيك (PLA) مثالاً لطيفاً لمنتج جديد لديه بعض الخصائص المشتركة مع البولي إثيلين والبولي بروبلين الموجودين. ومع ذلك، فإنه يوضح أيضاً التأثير لتكلفة مصادر الكربون على القدرة التنافسية للتقنية الحيوية في مجال البوليمرات الضخمة منخفضة الوظيفية. وهنا يعتمد سعر السوق الممكن تحقيقه اعتماداً مباشراً على تكلفة السلع والخدمات كما يتضح من العلاقة بين سعر النفط الخام ومؤشر بوليمرات البتروكيماويات.

منذ عام ١٩٩٨م، زاد سعر النفط بنحو عامل من خمسة، كما هو موضح في الشكل رقم (٩,٧). ولهذه التكاليف المتزايدة تأثير حاسم على القدرة التنافسية للمنتجات القائمة على المصادر الحيوية المتجددة، ومن بينها بوليمرات التقنية الحيوية.



الشكل رقم (٩,٧). العلاقة بين أسعار السوق للنفط الخام والبوليمرات [٤١].

فقط أصبحت المصادر الحيوية المتجددة مؤخراً قادرة على المنافسة إلى منتجات البتروكيماويات مثل الإيثيلين والبنزين على أساس تكلفة الكربون (الجدول رقم ٩,٢).

ومع ذلك، فإن الاستثمارات في التقنية الحيوية الصناعية هي استثمارات بعيدة المدى وتحتاج أيضاً لقدرة تنافسية طويلة المدى لقاعدة المواد الخام. وعلى المدى الطويل سوف تكون تكلفة المصادر الحيوية المتجددة مدفوعة من قبل أسواق الطاقة؛ بسبب سيطرتها. في الوقت الحالي يذهب ٩٣٪ من النفط الخام إلى إنتاج الطاقة على الصعيد

العالمي، ويتم استهلاك ٧٪ فقط في الصناعة الكيميائية. وأصبح التأثير المتزايد لسوق الطاقة على سعر المصادر الحيوية المتجددة واضحاً بالفعل. وتدفع زيادة إنتاج الإيثانول الحيوي طلب السوق على مصدره الأولي السكر، مؤديةً إلى علاقة بين السكر والإيثانول، وأسعار النفط. يبين الشكل رقم (٨, ٩)، تطور أسعار السكر بالتوازي مع الإيثانول الحيوي والنفط [٤٠]، وحيث إن تكلفة النفط والسكر مرتبطة بنسبة ٨٥٪، فإن الذرة يتبع ارتفاع تكلفة السكر (http://futures.tradingcharts.com).

الجدول رقم (٢, ٩). حجم إنتاج وأسعار مصادر الكربون الأولية.

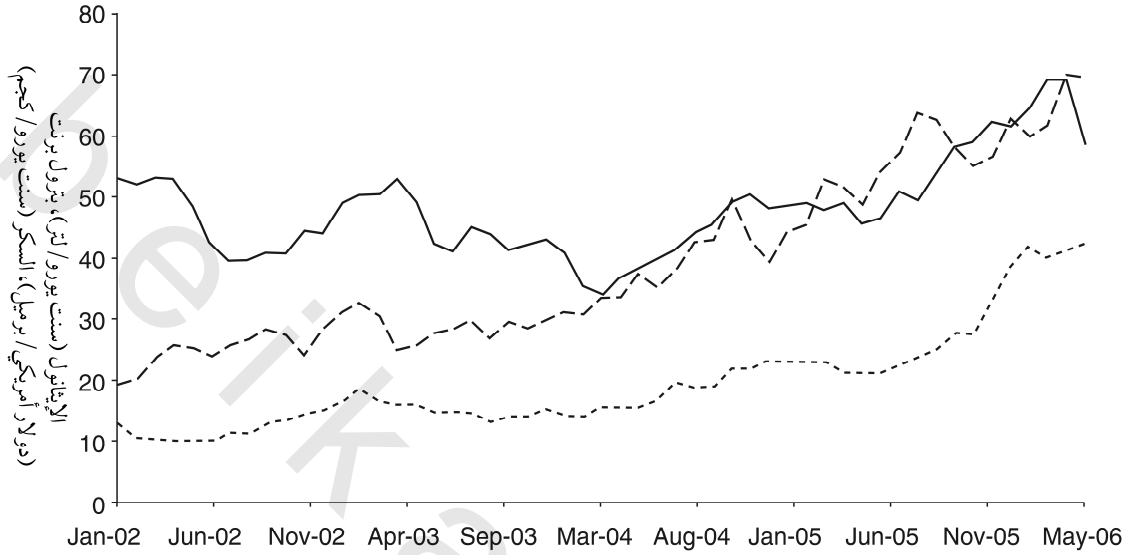
	الإنتاج (مليون طن/ عام)	السعر (يورو/ طن)	الكربون	الهيدروجين	الأوكسجين	الكربون (يورو/ طن كربون)
البتروكيماويات:						
إيثيلين C_2H_4	١١٠	٧٨٥	٨٦٪	١٤٪		٩١٧
بروبيلين C_3H_6	٧٥	٧٨٥	٨٦٪	١٤٪		٩١٧
بنزين C_6H_6	٤٥	٦١٠	٩٢٪	٨٪		٦٦١
المصادر الحيوية المتجددة:						
الجلوكوز $C_6H_{12}O_6$	١٤٣	٣٠٠	٤٠٪	٧٪	٥٣٪	٧٥٠
الإيثانول الحيوي C_2H_6O	٣٦	٣٦٥	٥٢٪	١٣٪	٣٥٪	٧٠٠

وبسبب هذه العلاقات يمكن حساب التكلفة التي سوف تكون عندها المصادر الحيوية المتجددة للنفط والمنتجات القائمة عليها قادرة على المنافسة. ونظراً لاختلاف محتوى الطاقة المختلف لها (البنزين ٣٢ جول متري/ لتر؛ الإيثانول ٢١ جول متري/ لتر) فإن مكافئ الطاقة القائم على البنزين يكون عند ٧٠ دولاراً أمريكياً/ برميل النفط أو ٤٠٠ يورو/ طن الإيثانول. ويحد هذا مع سيادة اقتصاديات عملية الإيثانول الحيوي اليوم من التكلفة القصوى للكربون لإنتاج الإيثانول الحيوي إلى ٢٣٨ يورو/ طن [٤١].

هل البوليمرات القائمة على التقنية الحيوية مثل PLA منافسة في أسواق المصادر الأولية كما وصف؟ بناءً على البيانات المنشورة على اقتصاديات عملية الـ PLA، يكون العائد من مونومر حمض اللاكتيك ٩٠٪، والعائد من البلمرة يكون ٨٠٪. وتكون حوالي ٤٠-٥٠٪ من تكلفة السلع والخدمات الكلية مرتبطة بحمض الاكتيك، وحوالي ٣٠٪ مرتبطة بسكر مصدر الكربون [٤٢، ٤٣].

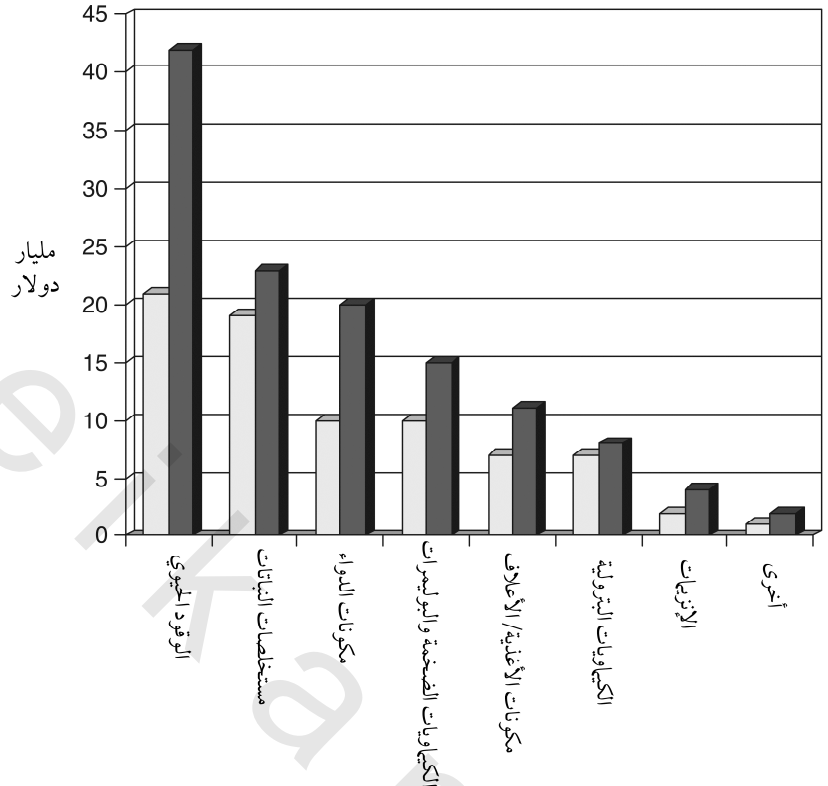
بدءاً من هذه البيانات مع بيانات السوق العامة فإنه يمكن تقدير ربحية السكر المحدودة بالتكلفة: عند سعر مبيعات حول ١١٠٠ يورو/ طن PLA يجب أن لا يتجاوز سعر السكر ٢١٠ يورو/ طن، وهذا هو أقل قليلاً من

سعر السوق الحالي [٤١]. ولكن ثمن البوليمر البتروكيماوي المنافس PET يكون في نفس المدى، مما لا يعطي PLA أي ميزة في التكلفة على البتروكيمياء.



الشكل رقم (٨, ٩). تطور أسعار النفط، والإيثانول والسكر، يناير ٢٠٠٢م إلى مايو ٢٠٠٦م. الخط الصلب، الإيثانول؛ الخط المتقطع، النفط؛ الخط المنقط، السكر. تكلفة الإيثانول في أوروبا اعتماداً على الإيثانول المجفف المنتج في البرازيل، بالإضافة إلى النقل (٤٥ يورو/ متر مكعب) ورسوم الاتحاد الأوروبي الجمركية (١٩٢ يورو/ متر مكعب).

بسبب عـدم وجود فوائد تكلفة حقيقية، فقد ترسخت التقنية الحيوية الصناعية حتى الآن فقط فـي تلك المجالات التي تكون فيها الخيار التقني الوحيد، وتم ذكر أمثلة مثيرة للإعجاب. على الرغم من أن المستقبل يكون دائماً مختلف عن ذلك المتوقع ويمكن أيضاً أن يعتمد علـى الاكتشافات الجديدة التي يمكن أن تغير تماماً ظروف معالم السوق، فمن المثير للاهتمام ملاحظة أن ماكينزي قدر حجم إجمالي مبيعات التقنية الحيوية الصناعية لتكون ٧٧ مليار دولار أمريكي في عام ٢٠٠٦م، كما هو موضح فـي الشكل رقم (٩, ٩) [٤٩]. ويمثل حجم المبيعات هذا شرفة ضيقة فقط لحوالي ٥٪ عند النظر إلى الصناعة ككل. ولذلك ينبغي أن يوضع في الاعتبار أنه قد يتم استبدال المنتجات المستمدة من الحفرات بنفس المنتجات القائمة علـى الصناعة الحيوية: فهناك حاجة لمركب جديد ذي أداءٍ أفضل من المنتج المستمد من الحفريات! وعليه يكون تـحسن أداء أو وظيفية المنتج النهائي، ومصانع التقنية الفريدة من نوعها وتحسينات الصحة والسلامة والبيئة هي المبررات الاقتصادية للاستثمارات في مجال التقنية الحيوية الصناعية.

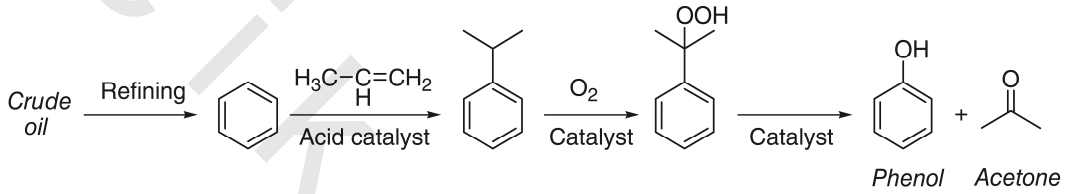


الشكل رقم (٩, ٩). قطاعات السوق للتقنية الحيوية الصناعية في ٢٠٠٥م (الفاتح) وفي ٢٠١٠م (الداكن).

على الرغم من العلاقات المتبادلة المعقدة والمتغيرة بين المواد الخام وأسواق المنتجات، فإنه من المهم أن تترك التقنية الحيوية الصناعية شرفتها ذات حجم مبيعات ٥٪ في الصناعة الكيميائية. وهذا في رأينا هو التحدي الأكبر وله في الوقت نفسه احتمالية مفاجئة مماثلة للتحولات الاقتصادية أو التقنية. وسوف يحدث هذا فقط إذا وفرت التقنية الحيوية عمليات تنافسية إلى الكيمياء الضخمة. يتم إنتاج عدة ملايين من الأطنان من المواد الكيميائية الضخمة كل عام وإحلال العمليات الحيوية النظيفة محل هذه العمليات ليس مهمة سهلة. وقد أظهر استبدال العملية الكيميائية للأكريلاميد كيف يمكن أن تكون مساهمة التقنية الحيوية الصناعية قوية على المستوى الواسع جداً، ولكن لا تزال المادة الأولية هناك (الأكريلونيتريل) مشتقة من الحفريات. وبالتأكيد فإن المزيد من التركيز على البحوث في اتجاه الطرق المعتمدة على الصناعة الحيوية "الخضراء" لإنتاج المواد الكيميائية الضخمة يكون مطلوباً. وقد تعطي التحسينات المهمة في المصادر الأولية الحيوية (على سبيل المثال، مصادر الكربون اللجنوسليولوزية)، والمحفزات والعمليات الحيوية دفعةً أخرى للتقنية الحيوية الصناعية. ويتناول المثال الوارد أدناه (نظري جزئياً) إنتاج الفينول.

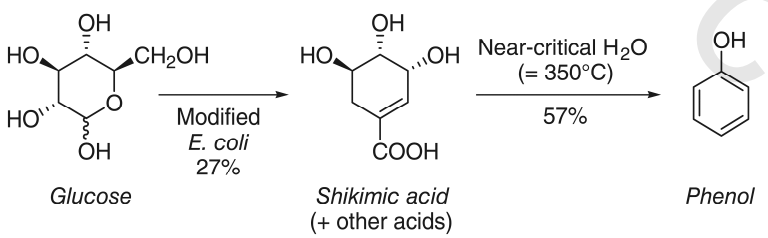
obeikandl.com

الفينول هو سلعة حقيقية، ينتج بمعدل ٨,٩ مليون طن سنوياً وزيادة سنوية قدرها ٦٪. ويستخدم كوحدة بنائية لراتنجات الفينول وكمادة بادئة للأدوية مثل الأسبرين. وعلى الرغم من أن الفينول يمكن الحصول عليه من قطران الفحم، إلا أن أسلوب الإنتاج الأكثر أهمية يعتمد على البنزين المشتق من الحفريات ومعطى في المخطط رقم (٩,١٥). في الخطوة الأولى، يتفاعل البنزين مع البروبين بفعل حافز حمضي منتجاً الكيومين. ويتم أكسدة هذا الأخير حفزياً وبعد ذلك يتحلل فوق الأكسيد منتجاً الفينول والأسيتون، والذي يباع كمنتج مزدوج. وهناك خوف أن يزيد سوق الفينول كثيراً بحيث يكون هناك فائض كبير من الأسيتون والذي سوف يؤثر في اقتصاديات العملية برمتها.



المخطط رقم (٩,١٥). عملية الإنتاج الحالية للفينول.

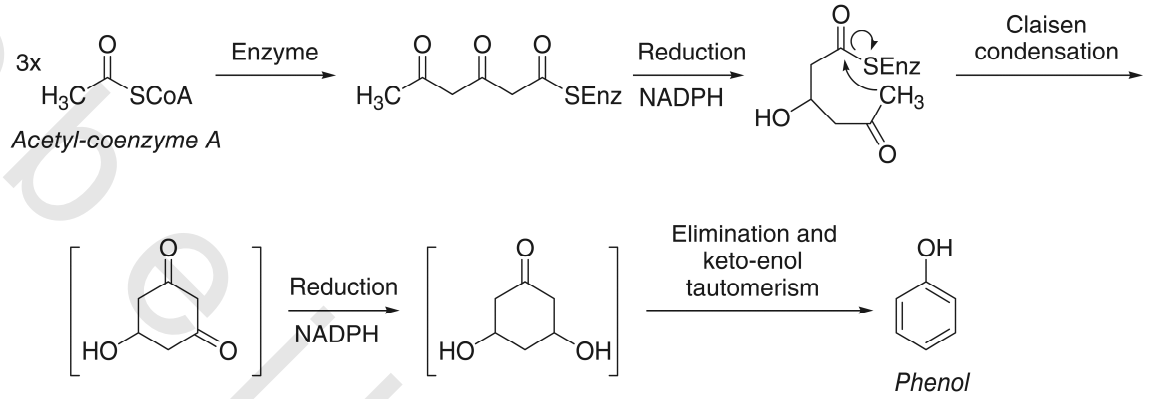
وقد ابتكرت مجموعة جون فروست في جامعة ولاية ميتشيجان عملية للفينول من المواد الأولية الحيوية (المخطط رقم ٩,١٦) [٤٦]. لقد استنسخوا المسار الكيميائي الحيوي لتحويل الجلوكوز إلى حمض الشيكيميك في إيشيريشيا القولون، وحصلوا على عائد ٢٧٪ من الشيكيمات (على الأساس المولي) بواسطة هذه السلالة المعدلة. وتم تحويل الشيكيمات بعد ذلك إلى الفينول في خطوة واحدة باستخدام المياه القريبة من الحالة الحرجة وبعائد ٥٧٪. وللأسف فالخطوة الثانية هي كثيفة الطاقة، شاملةً التسخين إلى ٣٥٠ درجة مئوية ومعدات ضغط عالي، ولكن إذا كان تجنب هذا ممكناً فقد تصبح هذه العملية أنيقة جداً وذات كفاءة.



المخطط رقم (٩,١٦). طريقة فروست للفينول.

باتخاذ نهج مجموعة فروست خطوةً أخرى إلى الأمام، يمكن للمرء حتى تشييد مسار تخليق حيوي كامل للفينول. ويظهر المسار النظري المعتمد على التخليق الحيوي للبولي كيتيدات في المخطط رقم (٩,١٧). والمركبات

الفينولية وفيرة في المملكة النباتية بحيث يتوقع الشخص أن مثل هذه البطارية من الإنزيمات يمكن العثور عليها في مكانٍ ما في النباتات أو يمكن تعديلها بطريقةٍ ما تجعلها تؤدي التفاعل المرغوب بشكلٍ انتقائي.



المخطط رقم (١٧ , ٩). مسار التخليق الحيوي النظري للفينول.

والتحدي الحقيقي، مع ذلك ليس إنتاج الفينول في هذا المسار أو أي مسار بيوكيميائي آخر، ولكن إنتاج الفينول على مستوى عديد المليون طن بتكلفة، دعنا نقول، واحد يورو للكيلوجرام. هذا يعني أننا في حاجة لكائنات حية دقيقة ذات إنتاجية عالية للغاية، جنباً إلى جنبٍ مع الثبات العالي وتحمل هذا المنتج السام جداً. كما أننا أيضاً بحاجة لتقنيات تجهيز نهائي ممتازة للحصول على الفينول بكفاءة من التيار المائي المتدفق (ليس مخففاً جداً!). وسوف يكون هذا هو التحدي الحقيقي في العقود القادمة.

من أجل الانتهاء: فقد تم ذكر [٤١] أنه يمكن تحليل الكتلة الحيوية حرارياً واستخدام النفط الناتج الذي يحتوي على الكثير من الفينولات، كمادة مضافة للفينول "الحقيقي" في إنتاج راتنجات الفينول–فورمالدهيد. ويقلل عدم وجود مرحلة التنقية من الطاقة اللازمة، ويمكن استخدام الغازات والفحم الناتج أيضاً كوقود لتسخين الكتلة الحيوية. ويزعم وجود وفورات في التكاليف تصل إلى ٢٥٪.

وعندما نستنبط مسارات جديدة للمواد الكيميائية الضخمة، يجب علينا أن ننظر بعناية في المواد البادئة المستخدمة. بصفة خاصة، تحتوي الكثير من المواد الكيميائية الضخمة المهمة (كابرولاكتام، والأكريلاميد، والبيريدين، وما إلى ذلك) على ذرة واحدة أو أكثر من النتروجين. ويعد تحويل النيتروجين الجزيئي إلى أمونيا، وهي المادة الخام لجميع المركبات المحتوية على النيتروجين في الصناعة الكيميائية (البتروكيميائية) هو تفاعل كثيف الطاقة للغاية. وعلى العكس، تحتوي الكتلة الحيوية على الكثير من النيتروجين الذي تم تثبيته من قبل الطبيعة في شكل الأحماض الأمينية، والبروتينات، والأحماض النووية. وتشكل البروتينات خاصة نسبة كبيرة من الكتلة الحيوية

ويمكن عزلها بسهولة وسيكون من المهم جداً النظر في تركيبها (الأحماض الأمينية) كمادة أولية للإنتاج الحيوي للكيماويات الضخمة المحتوية على النيتروجين [٤٧].

في الختام، تعد وجهات النظر للتقنية الحيوية الصناعية في الصناعات الكيميائية والدوائية وللشراكة المعنية لعلوم الأحياء، والكيمياء، والهندسة ممتازة اليوم وتكمل تقليداً ناجحاً من التفاعلات في القرن الماضي التي أدت إلى مساهماتٍ هائلة لنوعية الحياة البشرية [٤٤].

شكر وتقدير Acknowledgments

نود أن نشكر جميع علماء الصناعة الذين كانوا على استعداد لمشاركتنا بالمعلومات عن الكثير من العمليات المذكورة في هذا الفصل. ونحن مدينون على وجه الخصوص للدكتور جالت هويسمان (كوديكسيس)، والدكتور روبرت هولت (NPIL الصيدلية)، والأستاذ الدكتور بروجينك.

المراجع References

[١] Bruggink, A. (ed.) (2001) *Synthesis of β-Lactam Antibiotics, Chemistry, Biocatalysis and Process Integration*, Kluwer Academic, Dordrecht.

[٢] Wegman, M.A., Janssen, M.H.A., van Rantwijk, F., and Sheldon, R.A. (2001) Towards biocatalytic synthesis of β-lactam antibiotics. *Adv. Synth. Catal.*, **343,** 559–576.

[٣] Sonke, T., Kaptein, B., Boesten, W.H.J., Broxterman, Q.B., Schoemaker, H.E., Kamphuis, J., Formaggio, F., Toniolo, C., and Rutjes, F.P.J.T. (2000) Aminoamidase-catalyzed preparation and further transformations of enantiopure α-hydrogen-and α, α-disubstituted α-amino acids, in *Stereoselective Biocatalysis* (ed. R.N. Patel), Marcel Dekker, New York, pp. 23–58.

[٤] Bruggink, A., and Nossin, P. (2006) Assessment of bio-based pharmaceuticals; the cephalexin case, in *Renewables-Based Technology; Sustainability Assessment* (eds J. Dewulf and H. van Langenhove), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 315–329.

[٥] DSM Anti-Infectives (2004). DSMPure-Actives ™, A new standard in antibiotics. DSM Press Conference, Conference on Pharmaceutical Ingredients (CPhI), Brussels, 7 December. (see also www.dsm.com/en_US/html/dai/DSMPureActivesIntroduction.htm, accessed 1–9–2007).

[٦] Blaser, H.U. and Schmidt, E. (eds) (2004) *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale–Challenges, Approaches and Solutions*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[٧] Liese, A., Seelbach, K., and Wandrey, C. (2006) *Industrial Biotransformations*, 2nd edn, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[٨] Alphand, V., Carrea, G., Furstoss, R., Woodley, J.M., and Wohlgemuth, R. (2003) Towards large-scale synthetic applications of Baeyer–Villiger monooxygenases. *Trends Biotechnol.*, **21,** 318–323.

[٩] Hilker, I., Alphand, V., Wohlgemuth, R., and Furstoss, R. (2004) Microbial transformations 56. Preparative scale asymmetric Baeyer-Villiger oxidation using a highly productive " two-in-one " in situ SFPR concept. *Adv. Synth. Catal.*, **346,** 203–214.

[١٠] Hilker, I., Wohlgemuth, R., Alphand, V., and Furstoss, R. (2005) Microbial transformations 59: first kilogram scale asymmetric microbial baeyer–villager oxidation with optimized productivity using a resin-based in situ SFPR strategy. *Biotechnol. Bioeng.*, **92,** 702–710.

[١١] Wohlgemuth, R. (2007) Interfacing biocatalysis and organic synthesis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **82,** 1055–1062.

obeikandl.com

[١٢] Shapiro, R., DiCosimo, R., Hennessey, S.M., Stieglitz, B., Campopiano, O., and Chiang, G.C. (2001) Discovery and development of a manufacturing–scale synthesis of azafenidin. *Org. Proc. Res. Devel.*, **5,** 593–598.

[١٣] DiCosimo, R., Hann, E.C., Eisenberg, A., Fager, S.K., Perkins, N.E., Gallagher, F.G., Cooper, S.M., Gavagan, J.E., Stieglitz, B., and Hennessey, S.M. (2000) Biocatalytic production of 5-cyanovaleramide from adiponitrile. *ACS Symp. Ser.*, **767,** 114–125.

[١٤] Hann, E.C., Eisenberg, A., Fager, S.K., Perkins, N.E., Gallagher, F.G., Cooper, S.M., Gavagan, J.E., Stieglitz, B., Hennessey, S.M., and DiCosimo, R. (1999) 5-Cyanovaleramide production using immobilized *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Bioorg. Med. Chem.*, **7,** 2239–2245.

[١٥] DiCosimo, R., Stieglitz, B., and Fallon, R.D. (1998) Production of ω-cyano-carboxamides from aliphatic α, ω-dinitriles using *Pseudomonas putida*-derived biocatalysts. US Patent 5,728,556.

[١٦] Nakamura, C.E. and Whited, G.M. (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 454–459.

[١٧] Gross, R.A., Kumar, A., and Kalra, B. (2001) Polymer synthesis by *in vitro* enzyme catalysis. *Chem. Rev.*, **101,** 2097–2124.

[١٨] Duxbury, C.J., Wang, W., de Geus, M., Heise, A., and Howdle, S.M. (2005) Can block copolymers be synthesized by a single-step chemoenzymatic route in supercritical carbon dioxide? *J. Am. Chem. Soc.*, **127,** 2384–2385.

[١٩] Hilker, I., Rabani, G., Verzijl, G.K.M., Palmans, A.R.A., and Heise, A. (2006) Chiral polyesters by dynamic kinetic resolution polymerization. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45,** 2130–2132.

[٢٠] Davis, S.C., Grate, J., Gray, D.R., Gruber, J.M., Huisman, G.W., Ma, S.K., Newman, L.M., Sheldon, R.A., and Wang, L.A. (2006) Enzymatic processes for the production of 4–substituted 3-hydroxybutyric acid derivatives and vicinal cyano, hydroxy substituted carboxylic acid esters. US Patent 7,132,267.

[٢١] Fox, R.J., Davis, S.C., Mundorff, E.C., Newman, L.M., Gavrilovic, V., Ma, S.K., Chung, L.M., Ching, C., Tam, S., Muley, S., Grate, J., Gruber, J., Whitman, J.C., Sheldon, R.A., and Huisman, G.W. (2007) Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nat. Biotechnol.*, **25,** 338–344.

[٢٢] Matsuda, H., Shibata, T., Hashimoto, H., and Kitai, M. (1999) Method for producing (*R)*-4-cyano-3–hydroxybutyric acid lower alkyl ester. US Patent 5,908,953.

[٢٣] DeSantis, G., Chaplin, J.A., Weiner, D.P., Milan, A., Chi, E., Short, J.M., Madden, M.D., and Burk, M.J. (2003) Nitrilases. Intl. Publ. No. WO 03/000840.

[٢٤] DeSantis, G., Zhu, Z., Greenberg, W.A., Wong, K., Chaplin, J., Hanson, S.R., Farwell, B., Nicholson, L.W., Rand, C.L., Weiner, D.P., Robertson, D.E., and Burk, M.J. (2002) An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **124,** 9024–9025.

[٢٥] DeSantis, G., Wong, K., Farwell, B., Chatman, K., Zhu, Z., Tomlinson, G., Huang, H., Tan, X., Bibbs, L., Chen, P., Kretz, K., and Burk, M.J. (2003) Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through gene site saturation mutagenesis (GSSM). *J. Am. Chem. Soc.*, **125,** 11476–11477.

[٢٦] Holt, R.A., Blacker, A.J., and Reeve, C.D. (2003) Process for the preparation of dihydroxy esters and derivatives thereof. EP 1 282 719.

[٢٧] DECHEMA (2006) White biotechnology: An opportunity for Germany, a position paper released by DECHEMA (German Society for Chemical Engineering and Biotechnology).

[٢٨] Bommarius, A.S., Schwarm, M., and Drauz, K. (1998) Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals–examples and perspectives. *J. Mol. Catal. B Enzyme*, **5,** 1–11.

[٢٩] Tomlin, C.D.S. (ed.) (2003) *The Pesticide Manual*, British Crop Protection Council (BCPC), Alton, Hampshire.

[٣٠] Hermes, H.F.M., Sonke, T., Peters, P.J.H., van Balken, J.A.M., Kamphuis, J., Dijkhuizen, L., and Meijer, E.M. (1993) Purification and characterization of an L-aminopeptidase from *Pseudomonas putida* ATCC12633. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59,** 4330–4334.

[٣١] Hermes, H.F.M., Tandler, R.F., Sonke, T., Dijkhuizen, L., and Meijer, E.M. (1994) Purification and characterization of an L-amino amidase from *Mycobacterium neoaurum ATCC* 25795. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60,** 153–159.

[٣٢] Sonke, T., Ernste, S., Tandler, R.F., Kaptein, B., Peeters, W.P.H., van Assema, F.B.J., Wubbolts, M.G., and Schoemaker, H.E. (2005) L–Selective amidase with extremely broad substrate specificity from *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321. *Appl. Environ. Microbiol.,* **71,** 7961–7973.

[٣٣] van den Tweel, W.J.J., van Dooren, T.J.G., de Jonge, P.H., Kaptein, B., Duchateau, A.L.L., and Kamphuis, J. (1993) *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321: a new biocatalyst with broad-spectrum L-specifi c amidase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **39,** 296–300.

[٣٤] Cheetham, P.S.J. (1994) Case studies in applied biocatalysis–from ideas to products, in *Applied Biocatalysis* (eds J.M.S. Cabral, D. Best, L. Boross, and J. Tramper), Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 47–108.

[٣٥] Karlsson, A., Parales, J.V., Parales, R.E., Gibson, D.T., Eklund, H., and Ramaswamy, S. (2003) Crystal structure of naphthalene dioxygenase: side–on binding of dioxygen to iron. *Science,* **299,** 1039–1042.

[٣٦] Wohlgemuth, R. (2007) Modular and scalable biocatalytic tools for practical safety, health and environmental improvements in the production of speciality chemicals. *Biocatal. Biotransform.,* **25,** 178–185.

[٣٧] Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J., and Ballesteros, A. (2006) Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol.,* **24,** 281–287.

[٣٨] Wohlgemuth, R. (2006) Tools for selective enzyme reaction steps in the synthesis of laboratory chemicals. *Eng. Life Sci.,* **6,** 1–8.

[٣٩] Kunststoff Information (2007) www. kiweb.de www.tecson.de (accessed 1–9–2007).

[٤٠] Crop Energies AG (2006) *Wertpapierprospekt*, Mannheim (http://www.helaba.de/de/Unternehmen/GlobalMarkets/Aktienemissionen/ArchivIPO/CropEnergies.html, accessed 1–9–2007)

[٤١] Nordhoff, S., Höcker, H., and Gebhardt, H. (2007) Nachwachsende Rohstoffe in der chemischen Industrie–Weg vom Öl? *Chemie Ingenieur Technik,* **79,** 551–560.

[٤٢] Wolf, O. (ed.) (2005) Technoeconomic feasability of large-scale production of bio-based polymers in Europe. Technical Report EUR22103EN, European Communities, Brussels.

[٤٣] SRI Consulting (2005) Process Economics Program Report, 257. Menlo Park, CA.

[٤٤] Todd, A. (ed.) (1956) *Perspectives in Organic Chemistry*, Interscience Publishers Inc., New York.

[٤٥] Wong, C.-H., Garcia-Junceda, E., Chen, L., Blanco, O., Gijsen, H.J.M., and Steensma, D.H. (1995) Recombinant 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase in organic synthesis: use of sequential two-substrate and three-substrate aldol reactions. *J. Am. Chem. Soc.,* **117,** 3333–3339.

[٤٦] Gibson, J.M., Thomas, P.S., Thomas, J.D., Barker, J.L., Chandran, S.S., Harrup, M.K., Draths, K.M., and Frost, J.W. (2001) Benzene-free synthesis of phenol. *Angew. Chem. Intl. Ed.,* **40,** 1945–1948.

[٤٧] Scott, E., Peter, F., and Sanders, J. (2007) Biomass in the manufacture of industrial products–the use of proteins and amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **75,** 751–762.

[٤٨] Riese J. (2006) Industrial biotechnology–turning potential into profi ts, in *BIO World Congress* 07/13/2006 Toronto.

[٤٩] Winters, P. (2006) McKinsey & Company at World Congress, in *BIO press release* 07/13/2006.

obeikandl.com

الفصل العاشر

التقنية الحيوية الصناعية في قطاع الغذاء والأعلاف

INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY IN THE FOOD AND FEED SECTOR

بيير مونسان وميشائيل ج. أودنوا

Pierre Monsan and Michael J. O' Donohue

(١٠,١) المقدمة Introduction

منذ بداية التاريخ البشري، تم استخدام المنظومات الحية ومستخلصاتها على أساس تجريبي كامل لحل واحدة من أكثر الاحتياجات الأساسية للإنسان: كيفية إنتاج وتخزين المواد الغذائية. إن إنتاج الجبن والبيرة هما مثالان منذ نعومة أظفارنا في هذا المجال. في حالة الجبن، يتم تحويل منتج قابل للتحلل، الحليب، إلى مشتقاتٍ ثابتة، قابلة للتخزين، ولذيذة. ووضعت الاكتشافات اللاحقة، لاسيما بواسطة لويس باستور الذي أوضح دور الكائنات الدقيقة في الأغذية والمشروبات وتوصيف الإنزيمات الهضمية، نقطة تحول كبرى في نهج الإنسانية لإنتاج وتخزين الغذاء. منذ النصف الثاني من القرن العشرين، أنجب استخدام الإنزيمات الرشيد والسلالات الميكروبية في مجموعةٍ واسعةٍ من تطبيقات الأغذية والأعلاف فرعاً جديداً من العلم المعروف باسم "الهندسة الحيوية كيميائية".

وفي الآونة الأخيرة، مهد إدخال الهندسة الوراثية الطريق لتصميم المحفزات الحيوية المحسنة لتحويل المواد الزراعية الخام. وحقيقة أنه لا يوجد دنا خارجي داخل تحضيرات الإنزيمات تسمح باستخدام أساليب الهندسية الجزيئية هذه لزيادة كفاءة الإنزيم الحفزية. وهذا أمر مهم لأن القلق العام فيما يتعلق بالكائنات المعدلة وراثياً (GMOs) يعوق بشدة إمكانية الابتكار في مجالات كثيرة. ويجب في هذا الشأن التأكيد على أنه حتى لو كانت قطاعات الأغذية والأعلاف تقليدية بين مجالات التطبيق الرئيسة للتقنية الحيوية، فإن تطوير المكونات والعمليات الجديدة أصبح صعباً على نحوٍ متزايد؛ بسبب القيود التنظيمية الضيقة.

(١٠,٢) تطبيقات الغذاء Food Applications

(١٠,٢,١) تحويل النشا Starch Transformation

في النباتات، يتم تخزين الطاقة المستمدة من التمثيل الضوئي أساساً على صورة نشا، والذي يعد بدوره المصدر الرئيس للطاقة في وجبات غذاء البشر والحيوان. و يحتوي النشا تخطيطياً على اثنين من البوليمرات:

- الأميلوز، وهو بوليمر خطي يتألف من روابط ألفا-٤،١-جلوكوسيديك، وهو عموماً مكون ضئيل في النشا (حوالي ٢٥-٣٣٪).
- الأميلوبكتين، الذي يظهر درجة عالية من البلمرة عن الأميلوز وله تركيب مماثل ولكنه يحتوي على الروابط المتفرعة ألفا-١،٦.

يستخدم النشا لإنتاج الممددات الغذائية وعصائر السكريات مثل المالتوديسكترينات، والجلوكوز، وسكر العنب (الجلوكوز المنقي)، وسكر الفواكه، والمالتوز، والمشتقات المهدرجة (على سبيل المثال، السوربيتول، والمانيتول). والمصادر الرئيسة للنشا هي الذرة، والبطاطس، والقمح، والشعير، والأرز، والكسافا، والذرة الرفيعة [١].

وحققت العملية الصناعية الأولى لمعالجة النشا التحليل المائي باستخدام التحفيز الحمضي. تم إجراء التفاعل على معجون النشا (٣٠-٤٠٪ مواد صلبة جافة) وضبط درجة حموضته من ١,٥-٢,٠ باستخدام حمض الهيدروكلوريك. وتم إنهاء التحليل المائي عند ١٤٠-١٥٠ درجة مئوية في فترة زمنية ٥-٨ دقيقة. ومع ذلك، ففي التطويرات الأخيرة تم استخدام إنزيم ألفا-أميليز المحلل الداخلي ونازع البلمرة من الباسيلاس أميلوليكويفاشينس لتجنب توليد منتجات ثانوية غير مرغوب فيها ناتجة من أكسدة الكربوهيدرات والمحتوى الملحي. في البداية، تم تحقيق خطوة التسييل الإنزيمية هذه في درجة حموضة ٦,٠-٦,٥ لمدة ٥-٨ دقائق عند درجة ٨٥ درجة مئوية. ثم، يتم تسخين خليط التفاعل عند درجة ١٤٠ درجة مئوية لمدة ٥ دقائق لتحفيز تكوين الجيلاتين من النشا، ثم يبرد إلى ٨٥ درجة مئوية ليكون قادراً على إدخال دفعة ثانية من الإنزيم. وتسمح إضافة الإنزيم الثانية هذه بإنهاء تسييل النشا.

تم تحسين هذه العملية من خلال إدخال إنزيمات ألفا-أميليز جديدة ثابتة لدرجات الحرارة العالية من باسيلاس ليشينيفورميس أو باسيلاس ستيروثيرموفيلاس. ويمكن إضافة هذه الإنزيمات مباشرةً إلى معجون النشا عند درجة حموضة ٥,٨-٦,٢ في وعاء طبخ سريع يعمل عند درجة ١٠٣-١٠٧ لمدة ٥-١٠ دقيقة. وعليه، يتم القضاء على ضرورة المعالجة عند ١٤٠ درجة. ولمتابعة عملية الدكسترة، يتم تبريد النشا المسال إلى درجة ٩٥ وإضافة أيونات الكالسيوم لتجنب تغير طبيعة إنزيم الألفا-أميليز (حوالي ١٠ جزء في المليون). واعتماداً على المنتجات المستهدفة (سكر العنب، أو دي-جلوكوز النقي، أو المالتوز أو المالتوديكسترينات) يتم الحصول على

درجة تحليل مائي من ١٢-٣٠، وتوصف بقيمة الـ DE (مكافيء سكر العنب: نسبة القدرة الاختزالية المعبر عنها بسكر العنب إلى القوة الاختزالية الكلية الممكنة مكافئة للمادة الجافة).

ويمكن زيادة درجة التحليل المائي لإنتاج سكر العنب (خطوة التسكر) باستخدام مزيج من إنزيم تحليل خارجي، الجلوكوأميليز (أميلوجلوكوسيدسيز) من الأسبرجيلس نيجر، والقادر على تحليل روابط ألفا-١،٤ وألفا-١،٦ الجلوكوسيدية (الأخيرة تتحلل بمعدل أبطأ) وإنزيم مفكك للتفرعات خاص لتحليل روابط ألفا-١،٦، مثل البوليولانيز. وبعد ٤٠-٧٢ ساعة في درجة حموضة ٤,٢-٤,٦ ودرجة حرارة ٦٠، تتحقق نسبة DE من ٩٧-٩٩ موافقة لـ ٩٦-٩٧٪ من دي-جلوكوز.

ويمكن الحصول على شراب المالتوز المحتوي على ٥٠-٦٠٪ من المالتوديكسترينيات باستخدام الألفا-أميليز المطفر من الأسبرجيلس أوريزي أو البيتا-أميليز من أصل نباتي أو ميكروبي.

وأحد أهم التطبيقات الرئيسة لشراب سكر العنب هو الشراب عالي المحتوى من سكر الفواكه (HFCS) بالمصاوغة الإنزيمية للجلوكوز إلى سكر الفواكه (أيزوجلوكوز أو ليفيولوز) باستخدام إنزيم مصاوغة الجلوكوز. بسبب توازن التفاعل، يتم الحصول على شراب يحتوي على ٤٢٪ فركتوز مباشرةً، ولكن يتطلب الشراب المحتوي على ٥٥٪ فركتوز (يستخدم كبدائل للسكروز في المشروبات الغازية) الفصل اللوني للجلوكوز والفركتوز على راتنجات تبادل أيونات الكالسيوم أو البوتاسيوم لإنتاج محلول فركتوز تركيزه ٩٠٪. وتوجد مصادر مختلفة لإنزيم مصاوغة الجلوكوز لإنتاج الـ HFCS: الأكروباكتر، والأكتينوبلانيس، والأرثروباكتر، والباسيلس، والستروبتوميسيس. ويتم استخدامها كإنزيمات مقيدة في مفاعلات الأعمدة المستمرة.

ويعد تطوير بلورة إنزيم مصاوغة الجلوكوز على المستوى الصناعي من أهم الإنجازات الرئيسة في هذا المجال، والتي تسفر عن تحضير إنزيم نقي للغاية. وحيث إن إنزيم مصاوغة الجلوكوز حساس جداً للتثبيط بأيونات الكالسيوم ويحتاج أيونات الماغنيسيوم للثبات، فإنه لابد من إزالة أيونات الكالسيوم الزائدة من شراب سكر العنب بواسطة فصل التبادل الأيوني اللوني وإضافة المغنيسيوم قبل خطوة المصاوغة. ومع ذلك، فقد حلت التطورات الأخيرة في الهندسة الجزيئية للإنزيمات هذه المشكلة عن طريق تخليق ألفا-أميليز غير معتمد على الكالسيوم [٢، ٣]. لتحقيق ذلك، تم إثبات التفاصيل الدقيقة لارتباط الكالسيوم بإنزيم الألفا-أميليز من باسيلس ليشينيفورميس [٤].

ويعدُّ تطوير ألفا-أميليز محلل للنشا الخام هو تطور كبير في مجال تحليل النشا المحفز بالإنزيمات، والذي يحلل حبيبات النشا الخام بكفاءة. ويحتوي هذا الإنزيم من الأنوكسيباسيلس كونتامينانس يحتوي على أربعة نطاقات، بما في ذلك النطاق المرتبط بالنشا، وليس هذا هو الحال في إنزيمات ألفا-أميليز المحللة للنشا التقليدية [٥]. وتوجد

هذه النطاقات الرابطة للنشا عادةً بكثرة في الـ CGTases، والألفا-أميليز المطفر بالنسبة للمالتوز، والجلوكوأميليز. وهذا الألفا-أميليز الرباعي الأبعاد الأصلي قادر على تحفيز التحليل المائي للنشا عند درجة حرارة أقل من درجة حرارة تكوين جيلاتين النشا، وبالتالي تجنب المعالجة مرتفعة الحرارة المعتادة. ويمكن الحصول عند ٦٠ درجة مئوية في مزيج من الجلوكوأميليز من أسبرجيلس نيجر على نسبة إسالة ٩٩٪، موافقة لـ ٩٥٪ من سكر العنب (بدلاً من ٩٦,٣-٩٦,٥٪ في العملية التقليدية). وتعد العملية المماثلة الجديدة لتحليل النشا واعدة إلى حدٍ كبير، ولا سيما في سياق إنتاج الإيثانول الحيوي من النشا بواسطة التخمير الكحولي.

وبالمثل، فقد ثبت أن إضافة النطاق الرابط للنشا المستمد من الجلوكوأميليز من أسبرجيلس نيجر إلى الجلوكوأميليز من سلالة محللة للنشا من خميرة الخباز (سكارواميسيس سيرفيسي نوع دياستاتيكاس) تنتج إنزيم شيميري يحلل النشا غير القابل للذوبان [٦].

(١٠,٢,٢) صناعة الألبان Dairy Industry

إن تحويل الحليب إلى جبن ومختلف المنتجات الغذائية المصنعة هو جوهرياً عملية حيوية تنطوي على الإنزيمات والميكروبات التي توفر طريقة فعالة لتخزين هذه المادة السائلة الخام. في البداية، تمت هذه التحولات بطريقة تجريبية تماماً، حتى بدأ البشر في السيطرة عليها. ويتم اليوم ضبط عمليات التحويل الصناعي للحليب لتوفير منتجات ذات خصائص حسية ثابتة من مادة خام متغيرة. واللاعبين الرئيسين في هذا الصناعة هي شركة كريستيان هانسن، ودانيسكو روديا، وDSM. وتستخدم السلالات البادئة بكتيريا حمض اللاكتيك المنتجة من قبل هذه الشركات على نطاقٍ واسع. والأهم من ذلك، أنه حتى الآن لم تخضع هذه السلالات الميكروبية لأي هندسة وراثية.

(١٠,٢,٢,١) إنزيمات تخثر اللبن Milk-Clotting Enzymes

يقع الكابا-كازين، والذي يمثل حوالي ١٥٪ من كازيين الحليب، على محيط مذيلات الحليب. وينتج عن التحلل المائي الخاص لرابطة الببتيد ١٠٥فينيل ألانين-١٠٦ميثيونين في الكابا-كازين بواسطة المنفحة زعزعة استقرار وتجميع المذيلات، ويتم تسهيله بأيونات الكالسيوم [٧]، مؤدياً إلى تركيب هيكل هلامي والذي يتم قطعه ليعطي اللبن الرائب لصنع الجبن. وتكوين الرائب الخام هو مثال ممتاز لتعقيد التقنية الحيوية. ومن الصعب جداً الحصول على بيانات دقيقة للسوق في هذا المجال. ومع ذلك، فإن ثلاثة أنواع من الإنزيمات تتنافس على هذا السوق ويتغير استخدامها بدرجةٍ كبيرة تبعاً للتقاليد المحلية، واعتبارات التكلفة، وضغط المستهلك [٨]:

- المنفحة الحيوانية، وهي مزيج من الكيموسين والبيبسين وتستخرج بشكلٍ رئيس من معدة العجول (أبوماسوم).
- المنفحة الميكروبية، وهي إنزيم محلل للبروتين يفرز خارج الخلية يتم الحصول عليها من السلالات الفطرية (الكريفونيكتريا بارازيتيكا، والميوكر بوسيلوس ليندت، والريزوميوكر مايهي).
- الكيموسين المؤتلف، وهو نتاج للهندسة الوراثية ويعبر في الأسبرجيلس نيجر، والأسبرجيلس أوريزي، وإيشيريشيا القولون، أو الكليفيرومايسيس ماركسياناس ركتيس.

وكل هذه البروتييزات هي أسبارتيك إندوبروتييزات [٩]. ويعطي الجدول رقم (١٠,١). أرقاماً مؤقتة لاستخدامها. ومع ذلك، فهذه خاضعة للتغيير البالغ، كما ذكر سابقاً. ومثل الكيموسين المؤتلف في نهاية تسعينيات القرن العشرين في المملكة المتحدة حوالي ٧٠٪ من السوق. ومع ذلك، تسبب ضغط المستهلكين بسبب تنامي الشعور المضاد للكائنات المعدلة وراثياً في انخفاض هذا الرقم إلى ما يقرب من ٣٠٪. في فرنسا، ويعدُّ استخدام الكيموسين المؤتلف محدود للغاية وتمثل المنفحة الميكروبية أقل من ١٥٪ من السوق.

الجدول رقم (١٠,١). أسهم سوق إنزيمات تخثر الحليب.

	أوروبا	أمريكا الشمالية وأستراليا	باقي دول العالم
المنفحة الحيوانية	٥٥-٦٠٪	١٠٪	١٠٪
المنفحة الميكروبية	٣٠٪	٦٠٪	٤٥٪
الكيموسين المؤتلف	١٥-١٥٪	٤٠٪	٤٥٪

(١٠,٢,٢,٢) إنضاج الجبن والنكهة Cheese Ripening and Flavor

تستخدم البروتييزات والليبيزات لتطوير نكهات الجبن في الجبن المعدل بالإنزيمات (EMC) [١٠]. ويتم الحصول على هذه المنتجات المجففة بالرذاذ من الجبن قصير الإنضاج والذي يضاف إليه الإنزيمات والمواد المضافة [٩].

(١٠,٢,٢,٣) الليبيزات Lipases

تحفز الليبيزات التحليل المائي للدهون الثلاثية، والأحادية، والأحماض الدهنية، والجليسرول. ويعد تحرير الأحماض الدهنية الحرة ذو أهمية خاصة في الجبن الأزرق وأنواع الجبن الإيطالية [١١]، حيث إنها مسؤولة عن النكهة الحادة واللاذعة لهذه المنتجات. وتستخدم الليبيزات من الريزوميوكر مايهي وأجناس الأسبرجيلس

لهذا الغرض [٩]. وهذه الإنزيمات متخصصة في التحليل المائي للأحماض الدهنية الموجودة في الوضع ١،٣ في الدهون الثلاثية.

(١٠,٢,٢,٤) البروتييزات Proteases

بسبب تركيبها المتوازن جداً من الأحماض الأمينية، فإن بروتينات اللبن والشرش مصل اللبن تعد مواد بادئة مثالية لإنتاج المحللات لـ:

- التغذية المعوية وعن طريق الحقن.
- تغذية الرضع.
- مشروبات الصحة الرياضية والتحصين.
- أطعمة الحمية.

وتستخدم بروتييزات مختلفة تعمل داخلياً وخارجياً لتصنيع محلالات بروتين اللبن أو الشرش. وهي إما أن تكون من أصلٍ حيواني (البيبسين، وتربسين البنكرياس، والكيموتربسين)، وإما من أصلٍ نباتي (البابين، والبروميلين)، أو من أصلٍ ميكروبي (الباسيلس ساتليس، والباسيلس ليشينيفورميس) [٩]. وبالإضافة إلى استخدامها كبروتييزات، يمكن استخدام الأمينوببتيديزات الميكروبية على وجه الخصوص لإزالة الأحماض الأمينية الطرفية الكارهة للماء والتي تكون مسؤولة عن الطعم المر للببتيدات.

(١٠,٢,٢,٥) الليسوزيم Lysozyme

فضلاً عن كونه موجود في الدموع البشرية، فقد وجد الليسوزيم أيضاً في بياض بيض الدجاج. ويحفز هذا "المضاد الحيوي الطبيعي" تحليل رابطة بيتا-١،٤ بين حمض إن-أسيتيل موراميك وإن-أسيتيل جلوكوزأمين الموجود في جدار خلايا البكتيريا المحبة لصبغة الجرام. ويستخدم الليسوزيم في صناعة الألبان لتجنب نمو بكتيريا حمض البيوتيريك المنتجة للغاز، وخاصةً كلوستريديوم تيروبيوتيريكوم، ومنع "الانتفاخ المتأخر" للجبن [١٢، ١٣].

(١٠,٢,٢,٦) الإنزيم الناقل للجلوتامين Transglutaminase

تفاعل نقل الأسيل بين مجموعة جاما-كربوكسي الأميد للجلوتامين الطرفي ومجموعة إيبسلون- الأمينية لليسين الطرفية يتم تحفيزه بالإنزيم ناقل الجلوتامين. هذا ينتج في تشابك البروتينات وتناسجها ثلاثي الأبعاد. وهذا التفاعل مهم في الكثير من التطبيقات الغذائية، ولا سيما في صناعة الجبن الجديدة وضرب القشدة [١٤، ١٥].

(١٠,٢,٢,٧) بيتا-جالاكتوسيديز β-Galactosidase

يتحقق تحليل الاكتوز المائي وهو الكربوهيدرات الرئيس الموجود في الحليب الذي تنتجه الثدييات، باستخدام البيتا-جالاكتوسيديز، ويسمى أيضاً "اللاكتيز". ويحفز هذا الإنزيم تقسيم رابطة بيتا-١،٤ الجلوكوسيدية بين دي-جالاكتوبيرانوز ودي-جلوكوبيرانوز، السكرين اللذين يكونان اللاكتوز. تنتج حساسية الاكتوز المفرطة، الشائعة في سكان آسيا وأفريقيا من نقص إنزيم بيتا-جالاكتوسيديز في القناة الهضمية. وتؤدي هذه الحالة في الأشخاص المصابين إلى الانتفاخ، والإسهال، وامتلاء البطن بالغازات [١٦]. وتتميز إنزيمات اللاكتيزات الفطرية بدرجة حامضية مثلي، في حين تكون إنزيمات الخميرة والبكتيريا متعادلة. وتستخدم الأخيرة لإنتاج حليب منخفض اللاكتوز للأغراض الغذائية، فضلاً عن تحليل اللاكتوز في "الشرش الحلو". ويفضل في حالة "الشرش الحامض" الذي يحتوي على حمض اللاكتيك استخدام اللاكتيزات الفطرية [٩].

ونظراً لذوبان اللاكتوز المحدود فإن منع تبلور اللاكتوز يعد منطقة تطبيق أخرى له والتي تؤدي إلى ملمس "رملي" في الآيس كريم.

تم تقييد إنزيم البيتا-جالاكتوسيديز التجاري من كليفيرومايسيس فراجيليس (Lactozym^{TM}) تساهمياً على حبيبات السليلوز عن طريق ازدواجه مع الإيبيكلوروهيدرين. وميزة هذا التحوير هي أنه يمكن استخدام الإنزيم في مفاعل الوسادة المتخلخلة مما يسمح بأكثر من ٩٠٪ من تحليل لاكتوز الشرش خلال فترة خمس ساعات (على النقيض من ٤٨ ساعة عند استخدام الإنزيم بطريقة الدفعة المستمرة). وبالمثل، يحلل إنزيم البيتا-جالاكتوسيديز المقيد ٦٠٪ من اللاكتوز في الحليب في غضون خمس ساعات [١٧].

ويمكن أيضاً استخدام اللاكتوز كمادة أولية لإنتاج اللاكتوسكروز. ويتحقق هذا من خلال نقل وحدة بيتا-دي-فركتوفيورانوزيل من السكروز إلى وضع ألفا المصاوغ لشاردة دي-جلوكوبيرانوزيل من اللاكتوز. ويعد اللاكتوسكروز سكر تحلية صناعي غير قابل للهضم ذي خصائص محفزة لنمو البكتيريا في الجهاز الهضمي [١٨]. ويمكن تحفيز هذا التفاعل بإنزيم بيتا-فركتوفيورانوسيديز من جنس الأرثروباكتر K-1 باستخدام مفاعل محاكاة السرير المتحرك [١٩].

وقد اقترحت عملية جديدة لتحليل لاكتوز الحليب منزوع الدسم. وهي تشمل استخدام مفاعل أغشية الألياف المجوفة. يتم تدوير الحليب منزوع الدسم في تجويف الألياف، في حين يتم تدوير محلول إنزيم البيتا-جالاكتوسيديز عمودياً على التجويف. والمشكلة الرئيسة الموجودة هي نمو الميكروبات في محلول الإنزيم. ومع ذلك، يمكن تحقيق معدل تحويل ١١,٧٨٪ في مفاعل ألياف مجوفة ذو مساحة غشاء قدرها ٤,٩ م^{٢} باستخدام معدل تدفق الحليب منزوع الدسم قدره ٩,٩ لتر/ ساعة، ونشاط إنزيمي قدره ١٢٠ وحدة/ مل، ودرجة حرارة ٢٣±٢°[٢٠].

(١٠,٢,٣) صناعة الخبز Baking Industry

(١٠,٢,٣,١) الأميليزات Amylases

يعد إنزيم الألفا-أميليز الفطري من الأسبرجيلس أوريزي هو الإنزيم الأكثر استخداماً في الخبز [٩]. ويستخدم لإضافة نشاط الألفا-أميليز الموجود في الدقيق. والتأثير الرئيس هو الحد من لزوجة العجين خلال مرحلة تكوين جيلاتين النشا الأولي. بالإضافة إلى ذلك، يحسن الإنحلال المحدود للنشا إنتاج المالتوز بواسطة إنزيم البيتا-أميليز الداخلي، وبالتالي تخمر الخميرة وإنتاج ثاني أكسيد الكربون. يتميز هذا الإنزيم بثبات حراري محدود مما يسهل تعطيله بعد تكوين جيلاتين النشا الأولي عند ٧٠-٨٠ درجة مئوية، ويمنع التحليل المفرط للنشا. وبشكلٍ عام، فإن ينتج عن فعل الأميليز زيادة حجم الخبز وزيادة تجانس شكل لب الخبز.

والهدف الآخر لاستخدام الألفا-أميليز هو زيادة فترة عمر الرف للمنتجات المخبوزة من خلال تأثيره المضاد للتعفن. ويرجع التعفن أساساً إلى تدهور سلاسل الأميلوبكتين الجانبية [٢١، ٢٢]. وللحصول على تأثير مضاد للتعفن يلزم استخدام ألفا-أميليز ثابت حرارياً والذي يمكن أن يعمل بعد تكوين جيلاتين النشا. وللقيام بهذا، تم استخدام أميليز داخلي من الباسيلس أميلوليكويفاشينس [٩]. وكان استخدام الأميليز المطفر بالنسبة للمالتوز من الباسيلس ستيروثيرموفيلاس تحسناً واضحاً في مجال مكافحة التعفن (Novamyl®). وهذا الإنزيم هو أميليز خارجي يختصر سلاسل الأميلوبكتين الجانبية ويحرر سكريات المالتوأوليجو [٢٣، ٢٤]. وهو يقلل من تدهور الأميلوبكتين دون إضعاف شبكة الأميلوز اللازمة للحصول على شكل لب الخبز الأمثل [٢٥].

(١٠,٢,٣,٢) الزيلانيزات Xylanases

تشارك الأرابينوزيلانات غير القابلة للذوبان الموجودة في الدقيق في الإخلال باستقرار خلايا الغاز في العجين، بينما يكون للأرابينوزيلانات القابلة للذوبان خصائص وظيفية إيجابية، لا سيما الحفاظ على رطوبة المنتجات المخبوزة التي تكون ضرورية لأداء جيد لفترة التخزين [٢٤، ٢٦]. ولذلك، يجب أن تكون الزيلانيزات المستخدمة في الخبز متخصصة للغاية لتحليل الروابط بيتا-١،٤ الزيلوزيدية في الأرابينوزيلانات غير القابلة للذوبان، من أجل تجنب تحلل تلك القابلة للذوبان. وتوفر الزيلانيزات بنية محسنة للب، وزيادة الحجم، وقدرات تجهيز العجين الجيد [٢٧، ٢٨].

(١٠,٢,٣,٣) إنزيمات الأكسدة Oxidases

الجلوتين، جزء البروتين في الدقيق يلعب دوراً رئيساً في تركيب وثبات غلاف خلايا الغاز الناتجة خلال تخمير العجين. وحيث إن روابط السلفيد الثنائية بين جزيئات الجلوتين مهمة جداً لتقوية شبكة هذا البروتين، فإن

المؤكسدات تستخدم على نطاقٍ واسع في الخبز [٩، ٢٤]. وهي تحسن الثبات ضد إجهاد العجين، وحجم الخبز، وشكل اللب. ومن أجل تجنب استخدام المؤكسدات الكيميائية غير المرغوب فيها مثل البرومات والأزوداي كربون أميد (ADA)، فإنه يمكن استخدام الإنزيمات المؤكسدة التي تولد فوق أكسيد الهيدروجين. في وجود فوق أكسيد الهيدروجين، يقوم إنزيم الجلوتاثيون ديهيدروجينيز الداخلي بأكسدة الجلوتاثيون، وبالتالي يمنع تكوين الروابط ثنائية السلفيد بين جزيئات الجلوتين [٢٩]. وإنزيمات الأكسدة المنتجة لفوق أكسيد الهيدروجين المستخدمة بشكلٍ رئيس لهذا الغرض هي:

- جلوكوز أوكسيديز من أسبرجيلس نيجر، يؤكسد الجلوكوز إلى جلوكونولاكتون في وجود الأوكسجين.
- هيكسوز أوكسيديز من كوندرس كريسبس، عشب بحري منتج للكاراجينان، يؤكسد الجلوكوز، والجالاكتوز، والمالتوز، ...إلخ على نطاقٍ واسع [٣٠].
- الليبوأوكسيجينيز من فول الصويا أو دقيق الفول الذي يؤكسد الأحماض الدهنية غير المشبعة المحتوية على مجموعات سيس-سيس-١،٤ خماسية الدايين ولها تأثير مبيض على لب الخبز من خلال تفاعل فوق أكسيد الهيدروجين للأحماض الدهنية الناتجة مع الكاروتينات في العجين [٩].
- موكسد السلفهيدريل من أسبرجيلس نيجر [٣١].
- مؤكسدات البيروكسيد التي تؤكسد مجموعة متنوعة من المركبات في وجود فوق أكسيد الهيدروجين [٩، ٣٢].
- مؤكسدات البولي فينول التي تؤكسد المجموعات ثنائية الفينول إلى الكينينات [٩].

(١٠, ٢, ٣, ٤) الفوسفوليبيز Phospholipase

إن صفار البيض هو المستحلب الطبيعي المستخدم في إنتاج الكعك؛ وذلك لأن صفار البيض يحتوي على الليسيثين (٢,٨٪ من وزن البيضة)، والمكون الرئيس له هو الفوسفاتيديل كولين. وحيث إن الليزوفوسفاتيديل كولين له قوة استحلاب أكثر من الفوسفاتيديل، فقد تم تطوير إنزيم الفسفوليبيز A2 من الأسبرجيلس نيجر (CakeZyme™) بواسطة شركة DSM [٣٣] لتحفيز هذا التحليل انتقائي الفراغية. يؤدي هذا إلى ٢٠٪ خفض في استخدام البيض في وصفات الكعك. ويمكن تعويض فقدان الوزن المقابل (٧٥٪ أقل استخداماً للبيض) عن طريق إضافة كمية مناسبة من المياه. ويؤدي استخدام الفوسفوليبيز إلى زيادة حجم الكعك. وذلك لأن الليزوليسيتين يتراكب إلى جزء الأميلوز من النشا، والذي قد يؤدي إلى تأخر إعداد لب الخبز. بالمثل فإن المعالجة بالفوسفوليبيز توفر التحسن في لب الخبز والنعومة، وكذلك فترة تخزين أطول بسبب زيادة الاحتفاظ بالرطوبة.

(١٠,٢,٣,٥) الديكسترانسكريز Dextransucrase

يحتوي العجين الحامض على مجموعة متنوعة من بكتيريا حمض اللاكتيك، يوفر بعضها من بينها نشاط الديكسترانسكريز. وهذا الإنزيم هو ناقل للجلوكوز، ويحفز تخليق بوليمر متجانس من الجلوكان، والديكسترات (انظر القسم ١٠,٣,٢,٤) من السكروز. وقد ثبت أن إضافة الديكسترات إلى منتجات الخبز لها تأثير إيجابي على حجم الخبز ونعومة اللب. وقد عزلت شركة بوراتوس سلالة ليوكونوستوك ميزينتيرويديس LMGP-16878 من عجين البانيتون الحامض وطورت عملية للحصول على ديكسترات عالي الوزن الجزيئي كمكون وظيفي جديدة لمنتجات الخبز [٣٤، ٣٥].

(١٠,٢,٤) صناعة البيرة Beer-Making Industry

(١٠,٢,٤,١) التخمير Malting

إن واحدة من السمات الرئيسة لتخمير البيرة هي عملية التخمير التي تنقسم إلى ثلاث مراحل: النقع، والإنبات، وإيقاف الإنبات. والهدف من التخمير هو تشجيع التحليل الأمثل لجدران لخلايا في حبات الشعير من أجل توفير مستخلص ذي جودة قابلة للتخمر عند النقع. ولذلك، فإن نشاط إنزيمات الجلوكانيز والإنزيم المحلل للبنتوزان الداخلية مهمة تماماً مثل الأميليزات والبروتييزات. ومع ذلك؛ نظراً للتغير الطبيعي في الشعير وإضافة المساعدات (حبوب أخرى تحتوي على النشا) وخطوات العملية المؤدية إلى تثبيط الإنزيمات، فإنه يشيع أثناء النقع تعزيز نشاط الجلوكانيز والزيلانيز من خلال إضافة إنزيمات خارجية من أجل تحسين استخلاص النبتة وتحقيق التحليل الكامل للبيتا-جلوكان [٣٦]. ويكون هذا مهماً لنوعية المنتج النهائي؛ لأن وجود البيتا-جلوكان يساهم في ظاهرة تسمى البرد الضبابي، المصطلح الصناعي لمظهر الرواسب الهلامية المستحثة بالبرودة في البيرة [٣٧].

(١٠,٢,٤,٢) منع البرد الضبابي في البيرة Prevention of Chill Haze in Beer

ينتج عن تفاعل البروتينات مع البولي فينولات خلال إنتاج البيرة تكوين الضباب، وخاصةً أثناء التخزين البارد. وينتج هذا التفاعل أساساً من التأثيرات الكارهة للماء [٣٨]. وتتمثل إحدى طرق التعامل مع هذه المشكلة في امتصاص بروتينات الضباب النشطة على دعامات صلبة مثل السيليكا [٣٩]، وهذا مفيد في البيرة ذات المحتوى المعتدل من الشعير وفترة ثبات تخزين محدودة [٤٠]، أو البولي فينيل بيروليدون (PVPP). ويكون العلاج البديل هو استخدام البروتييزات. وبالمثل تم استخدام البابين لمنع البرد الضبابي عن طريق تحليل البروتينات إلى الببتيدات [٤١].

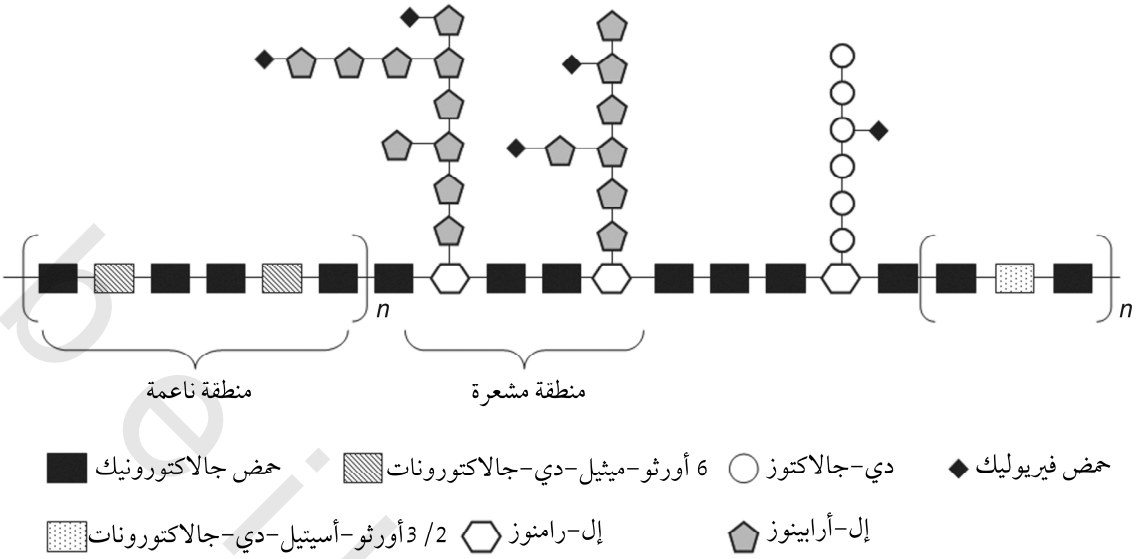
بدلاً من ذلك، واستناداً إلى ملاحظة أن البروتينات المشاركة في هذه الظاهرة غنية بالبرولين [٤٢، ٤٣]، فقد طور متخصصي الغذاء في شركة DSM بروتييز تخصصي للبرولين، BrewersClarex™، لهذا الغرض [٤٤]. وتم تطوير إنزيم برولييل البروتييز الداخلي الحامضي الذي يفرز خارج الخلايا من الأسبرجيلس نيجر، وينتمي إلى أسرة برولييل أوليجو ببتيديز [٤٥]، في البداية لإزالة الطعم المر من منتجات تحلل البروتين [٤٦]. ومن المثير للاهتمام، أنه بينما تتميز بروتينات رغوة البيرة النشطة بمحتوى منخفض للبرولين على عكس البابين، فإن المعالجة بهذا الإنزيم لا تؤثر على إستقرار الرغوة [٤٧]. وعلاوةً على ذلك، تجدر الإشارة إلى أن البيرة المعاملة بالإنزيم تحتوي على حوالي ٢٠٠ ملجم/ لتر من البولي فينول، في حين أن البيرة المعالجة بالـ PVPP تحتوي على ما يقرب من ١٢٥ ملجم/ لتر، والذي يكتسب أهمية غذائية؛ نظراً لتأثير البولي فينول المضاد للأكسدة.

(١٠, ٢, ٥) معاملة الفاكهة Fruit Processing

(١٠, ٢, ٥, ١) البكتينيزات Pectinases

تتم المعالجة الإنزيمية للثمار باستخدام مجموعة متنوعة واسعة من أنواع الإنزيمات. ومع ذلك، رغم أن الحاجة المحددة للإنزيم يتم تعيينها بشكلٍ دقيق بواسطة نوع الفاكهة وطبيعة خطوة التجهيز، فإن البكتينيزات هي أحصنة العمل الرئيسة [٩]. وتنتج البكتينيزات التجارية عادة بواسطة الأسبرجيلس [٤٨]، وهي مجموعة من الإنزيمات المختلفة التي تؤدي إلى تحليل البكتين، وهو مصطلح عام لخليط من السكريات المعقدة التي يختلف تركيبها؛ تبعاً لنشأتها النباتية (الشكل رقم ١٠,١) [٤٩]. والإنزيمات الرئيسة المحللة للبكتين هي البولي جالاكتورونيزات (EC 3.2.1.15). وتهاجم هذه الإنزيمات الداخلية السلسلة الرئيسة وتقسيم روابط البيتا-١،٤ التي تربط نهايات حمض الجالاكتورونيك. وتتواجد تشكيلة واسعة من هذه الإنزيمات، بعضها يكون أكثر أو أقل حساسية لمثيلة وسط التفاعل (إضافة مجموعة الميثيل). والإنزيمات الداخلية الأخرى هي الألفا-إل-أرابينيزات (EC 3.2.1.99) التي تزيل بلمرة الراسيميات المحتوية على الأرابينوز في المناطق المشعرة.

وتشمل الإنزيمات خارجية المفعول الإكسوبولي جالاكتورونيزات (EC 3.2.1.67)، وإل-أرابينوفيورانزسيديزات (EC3.2.1.55)، والفيريوليل إستريزات (EC 3.2.1.73)، والبكتين ميثيل إستيريزات (EC 3.2.1.11). وتزيل هذه الأخيرة مجموعات الميثوكسيل من البكتين وتنتج البكتين الميثانولي الحمضي والميثانول. والإنزيمات المذكورة حتى الآن كلها محللة، ولكن توجد البكتين ليبزات (EC 4.2.2.10) أيضاً عادةً في التحضيرات الفطرية. وتزيل هذه الإنزيمات الداخلية بلمرة سلسلة الجالاكتورونان الرئيسة من خلال تفاعل مزيل للبيتا والذي ينتج أوليجو يورونويدات.



الشكل رقم (١٠,١). تخطيط لهياكل البكتين. تظهر هياكل البكتين المشعرة والناعمة.

(١٠,٢,٥,٢) التعطين الإنزيمي للثمار Enyzmatic Maceration of Fruit

إن التعطين الإنزيمي للثمار هو تقنية راسخة جيداً في تجهيز الفاكهة. في هذه العملية، تتحلل جدران الخلايا النباتية من خلال مزيجٍ من البولي جالاكتورونيزات الخارجية، والبكتين ميثيل إستيريزات، والبكتين ليبزات، وتعظم السليوليزات استخراج العصير. وبالمثل، تقلل هذه المعالجة من لزوجة اللب وتقلل حجم الثفل (النفايات الصلبة التي تم الحصول عليها بعد الضغط). في بعض الفواكه التي تحتوي على كميات معتبرة من النشا (على سبيل المثال، التفاح والكمثرى)، تكون الأنشطة الإنزيمية الأخرى مثل الأميليز ضرورية للحصول على نتائج مرضية وللحد من الضباب، والذي يسببه وجود السكريات المعقدة [٥٠].

وعلى عكس عصير التفاح الرائق، يباع عصير البرتقال كمشروب غائم. لذلك، فإن المعالجة الحديثة وخطوات تكييف العصير ينبغي أن تعزز وتثبت غيوم المشروب. وعند وقت العصر تحتوي بكتينات البرتقال على مجموعات ميثيل أقل من بكتينات التفاح؛ لأن البرتقال يحتوي بشكلٍ طبيعي على مستوى أعلى بكثير من البكتين ميثيل إستيريزات الداخلية. وللأسف، سيتفاعل البكتين في صورته الحمضية مع أيونات الكالسيوم لتكوين بكتات الكالسيوم، مما يؤدي إلى ترسيب الجزيئات الغائمة التي تتكون من البكتين والبروتينات. ولتجنب هذا الأمر، يمكن تسخين العصير لتثبيط إنزيمات البكتين ميثيل إستيريزات حرارياً. ومع ذلك، يؤدي هذا النهج إلى تغييرات غير مرغوب فيها في جودة العصير. وبدلاً من ذلك، يمكن تجميد العصير لتثبيط الإنزيم بالبرودة. ومع ذلك، فإن نقل العصير المجمد يؤدي حتماً إلى ارتفاع التكاليف [٥٠].

(١٠,٢,٥,٣) العنب وصناعة النبيذ Grapes and the Wine Industry

يشكل العنب أعلى إنتاج للفاكهة في العالم (٦٠ مليون طن سنوياً) ويستخدم معظم العنب في إنتاج النبيذ. على الرغم من أن صنع النبيذ هو واحد من أقدم التقنيات الحيوية، إلا أن الفهم الأفضل للعمليات الحيوية الكيميائية المشاركة أدى فقط مؤخراً إلى تغذية تطوير تقنية الإنزيم. ومن بين أهداف التطوير بواسطة الإنزيم الخارجي، تم التركيز بشكلٍ خاص على الكربوهيدرات ومنتجات الأيض الثانوية الجليكوزيلاتية.

ويمكن استخدام الكربوهيدرات خارجية العمل (الجليكوسيديزات) التي تعمل على منتجات الأيض الثانوية الجليكوزيلاتية كمحسنات للنكهة في صنع النبيذ. وتحلل هذه الإنزيمات، وعموماً الألفا-إل-أرابينوفيورانوسيديزات، أو البيتا-دي-جلوكوسيديزات أو ألفا-إل-رامنوسيديزات بالتسلسل، شاردة الجليكون، التي غالباً ما تكون سكر ثنائي، وفي نهاية المطاف تحرر شاردة الأجليكون المتطايرة [٥١، ٥٢]. والأمثلة التجارية لمثل هذه الإنزيمات هي النوفاروم بلانك (Novozymes A/S Bagsvaerd)، وهو مستحضر بكتينيز يحتوي على أنشطة جليكوسيديز جانبية مهمة، ولالزيم بيتا (Lallemand Inc., Montreal)، وهو أيضاً مزيج من البكتينيزات التي تحتوي ألفا-إل-أرابينوفيورانوسيديز، وبيتا-دي-جلوكوسيديز، وبيتا-دي-أبيوسيديز، وألفا-إل-رامنوسيديزات.

والبديل لإضافة الجليكوسيديزات الخارجية أثناء إعداد النبيذ هو استخدام سلالات الكائنات المعدلة وراثياً. وبالمثل، تم تعديل سلالات الخميرة المستخدمة في صنع النبيذ وراثياً باستخدام الجينات المشفرة للجليكوسيديزات المختلفة. ورغم أن هذه السلالات أظهرت إنتاجية نبيذ ذي خصائص عطرية متفوقة [٥٣]، فإن أياً منها لم يستخدم تجارياً حتى الآن.

(١٠,٣) الأغذية وتطبيقات الأعلاف Food and Feed Applications

(١٠,٣,١) البروبيوتيك Probiotics

تعرف منظمة الأمم المتحدة للأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية البروبيوتيك "بالكائنات الحية التي عندما تستخدم بكميات مناسبة تضفي منافع صحية على المضيف" [٥٤]. يحتوي جسم الإنسان على خلايا ميكروبية أكثر بحوالي عشرة أضعاف من الخلايا البشرية. بعد الولادة، تستعمر أمعاء الإنسان تدريجياً من قبل سلالات ميكروبية، بدءاً من بيئة مهبل الأم. ولا تزال معرفتنا وفهمنا لدور البكتيريا في الجهاز الهضمي محدودة للغاية، حتى لو وفرت طرق البيولوجيا الجزيئية مثل دراسات الميتاجينوميات رؤى أعمق في هذا المجال. ويبدو أن المحتوى الميكروبي للأمعاء مستقر نسبياً في الفرد، ولكن يختلف بصورةٍ كبيرة من فردٍ إلى آخر.

وقد ناقشت الأبحاث العلمية المنشورة أكثر وأكثر دور المحتوى الميكروبي للأمعاء في المشكلات الصحية مثل السمنة [٥٥] واضطرابات التمثيل الغذائي (مرض السكري، وأمراض القلب والأوعية الدموية) [٥٦]. وبالإضافة إلى ذلك، فإن التنشيط الميكروبي يلعب دوراً رئيساً في تطوير نظام المناعة في الجسم البشري، حيث تتفاعل الكائنات الحية الدقيقة مع كلٍ من نظام المناعة الفطرية والمكتسبة [٥٧].

لقد تم اختيار البروبيوتيك، أساساً اللاكتوباسيلاي والبيفيدوباكتيريا الناشئة من محتوى الأمعاء في البشر الأصحاء، لخصائصها الخاصة في طرق الفرز المفصلة. وهي متوفرة للمستهلك كمساحيق أو أقراص، ولكن أكثر شيوعاً كمنتجات قائمة على الحليب [٥٨]. يمكن الاستشهاد بذلك بوصفها نتائج مفيدة لبني البشر، وكذلك للحيوان المضيف [٥٧]:

- الخصائص المضادة للعدوي.
- الآثار المناعية.
- وظائف الحاجز المحسنة.
- التأثيرات الأيضية.
- تغيرات في حركة الأمعاء أو الوظيفة.

ومن أمثلة الاضطرابات المستهدفة:

- الإسهال، بما في ذلك ما ينجم عن فيروس الروتا في الأطفال [٥٩، ٦٠] أو كلوستريديوم ديفيسيلي في المرضى المسنين [٦١] أو الأسباب الأخرى عند الرضع [٦٢، ٦٣].
- الباوشيتيس [٦٤، ٦٥].
- متلازمة القولون العصبي [٦٦].
- سرطان المثانة باستخدام لاكتوباسيلس كازي [٦٧].
- عدوى الجهاز البولي التناسلي [٦٧].
- عدوى الكلوستريديوم ديفيسيلي باستخدام سكارروميسيس بولارديای [٦٨].
- الأكزيما الاستشرائية باستخدام لاكتوباسيلس رامنوساس ولاكتوباسيلس رويتيري [٦٩].

وتم مؤخراً تعزيز استخدام البروبيوتيك في حالة تربية الحيوانات بواسطة قرار الاتحاد الأوروبي بحظر استخدام المضادات الحيوية كمحفزات لنمو الماشية. ومبكراً في ١٩٧٣م تم بيان مقاومة الفراخ حديثة الفقس لمستعمرات السالمونيلا؛ نتيجة إعطائها محتويات الأمعاء للطيور البالغة السليمة [٧٠]. ويعرف هذا المفهوم بالاستبعاد التنافسي.

وبسبب التنوع الواسعة للمنتجات البروبيوتيك الحالية في السوق، لا تزال هناك حاجة مهمة للتجارب السريرية المحكومة المصممة بعناية، والعشوائية والوهمية. ومن الضروري أيضاً فك شفرة الآليات الجزيئية الخاصة المشاركة لكل سلالة بروبيوتيك من أجل تعزيز الإدعاءات المقابلة. والشركات الرئيسة المشاركة في سوق البروبيوتيك هي بيوجايا للحيويات، وكريستيان هانسن، وكوناجرا للأغذية الوظيفية، ودانيسكو، ودانون، ومعهد روسيل (Lallemande)، ولايف واي للأغذية، وناترين، ونستله، والبحار السبعة، وستوني فيلد فارم، وياكولت.

تم تعريض سلالات اللاكتوباسيلاي والبيفيدوباكتيريا للتعديل الوراثي. وقد كان الدافع وراء هذا التطور ليس فقط الرغبة في فهمٍ أفضل لدور هاتين المجموعتين من البكتيريا في الأمعاء، ولكن أيضاً لتحسين خصائص البروبيوتيك الموجودة لها (تنبيه المناعة، وتخليق الفيتامينات، ومحددات استعمار الخلايا)، وتطوير خصائص جديدة (تطوير اللقاحات الفمية، وإنتاج مضادات الجراثيم، والإنزيمات الهضمية، والأجسام المضادة، والسيتوكينات) [٧١، ٧٢]. ومع ذلك، فإن نقل الجينات داخل الكائنات الحية والقبول العام للكائنات المحورة وراثياً كان مفتاح القلق على هذا المستوى.

(٢, ٣, ١٠) البريبيوتيك Prebiotics

وكان النهج بديل أو المكمل لاستخدام البروبيوتيك هو إضافة المكونات الميكروبية الرئيسة للبيئة المعوية مباشرةً . لهذا الغرض تم تطوير الكربوهيدرات غير القابلة للهضم. وتم تصميمها في البداية كمكونات غذائية منخفضة السعرات الحرارية ("ألياف قابلة للذوبان")، وقد أظهرت سكريات الأوليجو غير القابلة للهضم هذه إمكانية امتصاصها جزئياً وتمثيلها غذائياً بتخصصية بواسطة مكونات البيئة المعوية. وأدى ذلك إلى مفهوم "البريبيوتيك" الموضوع أصلاً في اليابان والمعرف بأنه مكونات غذائية "غير قابلة للهضم تؤثر بصورة مفيدة في المضيف عن طريق تحفيز النمو انتقائياً و/ أو نشاط واحد أو عدد محدود من البكتيريا في القولون، ومن ثم تحسين صحة المضيف" [٧٣].

تتشارك البريبيوتيك في خاصية كونها تقاوم جزئياً أو كلياً فعل الإنزيمات الهضمية في البشر والحيوانات. وبالمثل، لا يتم تمثيلها غذائياً مباشرة من قبل المضيف ويمكنها الوصول إلى القولون، حيث تعمل كوسط تفاعل خاص للبيئة الميكروبية. وتتفاعل أيضاً مع مستقبلات الكربوهيدرات الموجودة على سطح الخلايا الميكروبية أو الطلائية، مما يؤثر في التصاق الخلايا والتعديل المناعي [٧٤]. ويتم الحصول على سكريات الأوليجو غير القابلة للهضم بواسطة طرق مختلفة:

- الاستخلاص من المصادر النباتية: سكريات الفركتوأوليجو، والألفا-جالاكتوأوليجو.
- التحليل الإنزيمي المحكوم للسكريات النباتية الكثيرة: سكريات الفركتوأوليجو، والزيلوأوليجو.
- التخليق الإنزيمي: سكريات الفركتوأوليجو، وسكريات الألفا-جالاكتوأوليجو، والبيتا-جلوكوأوليجو، والبيتا- جالاكتوأوليجو.

(١٠,٣,٢,١) الإنيولين Inulin

الإنيولين هو بوليمر خطي لسكر الفواكه يحتوي على روابط بيتا-٢،١ ووحدة سكروز في النهاية غير الاختزالية. يتم استخدامه من قبل عدة نباتات لتخزين الطاقة، وخاصةً الشيكوريا (شيكوريوم أنتيبوس) وخرشوف القدس (هيليانساس توبيروساس). ويمكن تحليله تماماً لإنتاج سكر الفواكه، باستخدام إينولينيز خارجي فقط أو في مزيج مع إينولينيز داخلي، أو لإنتاج سكريات الفركتوأوليجو باستخدام إينولينيز داخلي فقط [٧٥-٧٨]. والفائدة الرئيسة لهذا الفركتان هو أنه يحتوي على روابط جلوكوسيدية لا يمكن تحليلها بإنزيمات الإنسان والحيوان الهضمية. ومن ثم يمكن اعتبار الإنيولين وسكريات الأوليجو إنيولين الناتجة بالتحليل الإنزيمي المحكوم "بريبيوتيك" [٧٩، ٨٠]: يتم تمثيل هذه الكربوهيدرات غير القابلة للهضم تخصصياً بواسطة مكونات البيئة المعوية الدقيقة، البيفيدوباكتيريا، مما يؤدي إلى آثار صحية إيجابية [٨١].

وقد تم تطوير مفهوم "الأغذية الوظيفية" خلال السنوات الخمسة عشر الماضية، مع فهم أهمية البيئة المعوية في مشكلات الجهاز الهضمي. وقد تجلي الأثر الإيجابي لمثل هذه الألياف الغذائية في البيئة المعوية الدقيقة [٨٢]، وامتصاص المعادن [٨٣]، والتمثيل الغذائي للدهون، وتسرطن القولون، ووظائف المناعة في الجهاز الهضمي.

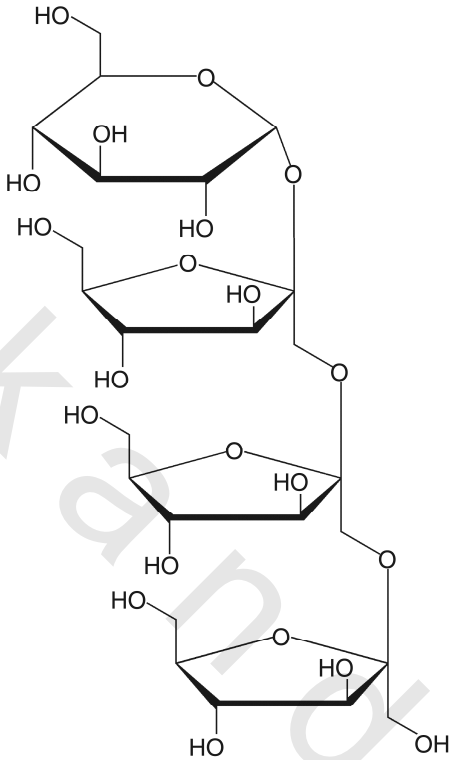
ويتم تسويق إنيولين البريبيوتيك وسكريات الفركتوأوليجو المشتقة من قبل شركات مختلفة، خاصةً أورافتي، فرع لشركة Südzucker، تحت الاسم التجاري Beneo®. وتوجد أيضاً سكريات فركتوأوليجو مماثلة في النباتات المختلفة [٨٤]، مع مستويات عالية خاصةً في البصل [٨٥] والأسبرجاس [٨٦].

(١٠,٣,٢,٢) سكريات الفركتوأوليجو Fructooligosaccharides

يتم الحصول على سكريات الفركتوأوليجو المحتوية على وحدات بيتا-دي-فركتوفيورانوز مرتبطة بروابط ٢،١-جلوكوسيدية أيضاً عن طريق التخليق الإنزيمي من السكروز، باستخدام إنزيم فركتوزيل ترانسفيراز من الأسبرجيلس نيجر أو الأوريوبازيديوم بوليولاناس [٨٧، ٨٨]:

$$\underset{\text{sucrose}}{n\ \text{Glc-Fru}} \xrightarrow{\text{fructosyltransferase}} \text{Glc-(Fru)}_n + (n-1)\ \text{Glc}$$

وعليه يتم الحصول على سلسلة من سكريات الفركتوأوليجو ذات زيادة في درجة البلمرة (الشكل رقم ١٠,٢). ويتم تسويق هذه المنتجات من قبل شركة بيجين-ميجي، وهي شركة مشتركة بين تيريوس وميجي سايكا، تحت الأسماء التجارية Actilight® و Profeed®.



الشكل رقم (١٠,٢). تركيب النيستوز، سكر رباعي من ألفا-٢،١-فركتوفيورانوزيل ذو شاردة جليكوزيل طرفية. من [٧٤].

(١٠,٣,٢,٣) سكريات الجالاكتوأوليجو Galactooligosaccharides

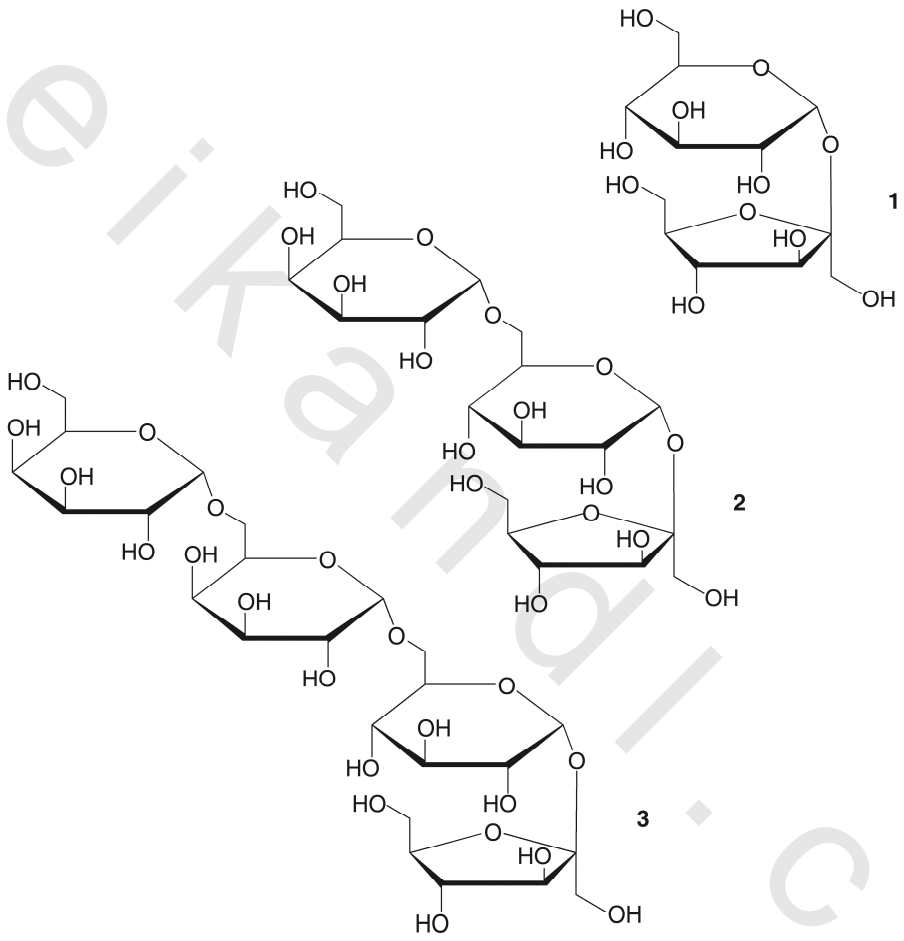
يتم إنتاج سكريات الألفا-جالاكتوأوليجو عن طريق الاستخلاص من المصادر النباتية، وخاصةً فول الصويا [٨٩]. وهي تتكون من سلسلة من مشتقات ألفا-٦،١-جالاكتوزيل من السكروز (الشكل رقم ١٠,٣): الرافينوز، والستاكيوز، والفيرباسكوز، على التوالي، تحتوي على مجموعات طرفية لـ ١ و٢ و٣-ألفا-دي-جالاكتوزيل. تستخدم سكريات الألفا-جالاكتوأوليجو كبريبيوتيك في اليابان. كما أنها أيضاً مسؤولة عن مشكلات الانتفاخ بعد استهلاك البقوليات.

يتم الحصول على سكريات البيتا-جالاكتوأوليجو من نشاط الجالاكتوزيل ترانسفيريز لإنزيم البيتا-جالاكتوسيديز، من الأسبرجيلس أوريزي على سبيل المثال [٩٠]، على اللاكتوز، الموجود في الشرش، المنتج

الثانوي للألبان، وفقاً لمخطط التفاعل التالي:

$$\underset{\text{lactose}}{\beta\text{-D-Gal-1,4-D-Glc}} \xrightarrow{\beta\text{-galactosidase}} (\beta\text{-D-Gal})_n\text{-D-Glc} + (n-1)\ \text{D-Glc}$$

تحتوي هذه المنتجات على روابط بيتا-٦،١-دي-جالاكتوزيلية، بالإضافة إلى رابطة بيتا-٤،١ للاكتوز، ومعروفة كسكريات ترانس جالاكتوأوليجو (TOS).



الشكل رقم (١٠,٣). تركيب السكر الثلاثي الرافينوز (٢) والسكر الرباعي ستاكيوز (٣) مشتقات ألفا-٦،١ من السكر الثنائي السكروز (١). من [٧٤].

يحتوي تكوين المنتج الذي تم تطويره من قبل بوركولو دومو للمكونات، Lactifit®، سكريات أوليجو تصل إلى درجة بلمرة (DP) من ٨ (الجدول رقم ١٠,٢) [٩١]. وهي لا تهضم أنها وتحفز نمو البيفيدوباكتيريا بشكلٍ انتقائي وتقلل سمية محتويات القولون [٩٢].

obeikandl.com

الجدول رقم (٢ , ١٠). تركيب Lactifit® من [٩١].

المكون	٪ وزن/ وزن مادة جافة
سكريات ترانس جالاكتوأوليجو	٪٦٠
DP2	٪٣٣
DP3	٪٣٩
DP4	٪١٨
DP5	٪٧
DP6-8	٪٣
لاكتوز	٪٢٠
جلوكوز	٪١٩
جالاكتوز	٪١

(٤ , ٢ , ٣ , ١٠) سكريات الجلوكوأوليجو Glucooligosaccharides

سكريات الأيزومالتوأوليجو هي أوليجومرات دي-جلوكوبيرانوزيل تحتوي أساساً على روابط ألفا-٦،١ [٩٣]. يتم إنتاجها من محللات النشا عن طريق المعالجة بألفا-ترانس جلوكوسيديز من جنس الأسبرجيلس، لأن روابط ألفا-٦،١ أكثر استقراراً حرارياً من روابط ألفا-٤،١ [٩٤]. في هذه الحالة، يعمل المالتوز والمالتوديكسترينات الموجودة في محللات النشا كوحدتي دي-جلوكوبيرانوزيل مانحة ومتقبلة. وسكريات الأيزومالتوأوليجو هي واحدة من منتجات البريبيوتيك الرئيسة في السوق اليابانية، المنتجة على سبيل المثال عن طريق شركة هاياشيبارا [٩٥].

ويمكن أيضاً الحصول على سكريات الأيزومالتوأوليجو عن طريق الفعل المشترك للجلوكوأميليز والبوليولانيز على محللات النشا. وقد تم تطوير هذه العملية من قبل شركة شوا سانجيو اليابانية [٩٦]. وتكون الطريقة الأخرى للإنتاج باستخدام إنزيم نيوبوللیولانيز من الباسيلس ستيروثيرموفيلاس المعدلة بالطفرة موجهة الموقع لتحفيز تفاعل نقل الجلوكوزيل [٩٧].

والطريق الآخر لتخليق سكريات الجلوكوأوليجو هو استخدام تفاعل نقل الجلوكوزيل الذي يتم تحفيزه بإنزيمات الجلوكان سكريزات، واستخدام السكروز كمانح لمجموعة الدي-جلوكوزيل:

$$\underset{\text{sucrose}}{n\ \text{Glc-Fru}} \xrightarrow{\text{Glucansucrase}} (\text{Glc})_n + (n-1)\ \text{Glc}$$

في وجود السكروز وحده، يمكن الحصول على سكريات الجلوكان مرتفعة الوزن الجزيئي مع مجموعة واسعة من التركيبات [٩٨]، وفقاً للانتقائية الفراغية للجلوكان سكريز [٩٩]:

- الديكستران، يحتوي على أكثر من ٥٠٪ روابط ألفا-١،٦: ديكستران سكريز.
- الميوتان، يحتوي على أكثر من ٥٠٪ روابط ألفا-١،٣: ميوتان سكريز.
- ألترنان يحتوي على روابط ألفا-١،٣ و ألفا-١،٦ بالتناوب: ألترنان سكريز.
- أميلوز، يحتوي على ١٠٠٪ روابط ألفا-١،٤: أميلوسكريز.

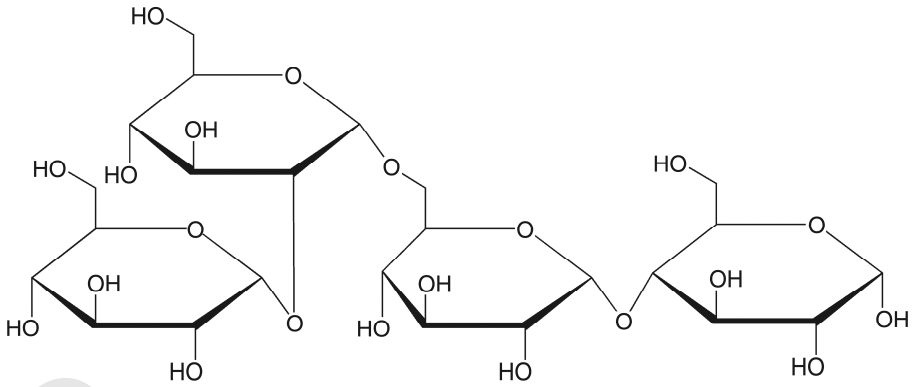
عند إضافة متقبل كفء إلى وسط تفاعل السكروز، مثل المالتوز أو الأيزومالتوز على سبيل المثال، فإنه يتم تخليق سكريات أوليجو منخفضة الوزن الجزيئي [١٠٠].

تستخدم شركة كارجيل ألترنان سكريز لتنتج من السكروز والمالتوز خليط تحلية من البريبيوتيك، Xtend™ Sucromalt [١٠١] يحتوي على كلٍ من الفركتوز المتبقي وسكريات الألترنان أوليجو. يمكن إنتاج ألترنان سكريز من ليوكونوستوك ميزينتيرويديس NRRL B-1355، والتي عزل منها جين الترميز المقابل [١٠٢، ١٠٣]. وجنس البنسليوم يكون أيضاً مصدراً محتملاً لهذا الإنزيم [١٠٤]. وتم توضيح كفاءة سكريات الأوليجو المقابلة للسيطرة على البكتيريا المعوية المسببة للأمراض [١٠٥]. ومن المثير للاهتمام، أنه قد تم تصميم أشكال اقتطاعية نشطة بشكلٍ كامل من ألترنان سكريز، محذوفة في قطاع نهاية الكربون ("قطاع ارتباط الجلوكان") بكفاءة [١٠٦].

يحفز الديكستران سكريز من ليوكونوستوك ميزينتيرويديس NRRL B-1299 تخليق بوليمرات الديكستران المحتوية على ٢٧-٣٥٪ روابط فرعية ألفا-١،٢، وغالباً غير قابلة للذوبان ومرتبطة بالطبقات الخارجية للخلية [٩٤، ٩٨]. يحتفظ هذا الإنزيم بتخصصيته عند استخدام المالتوز كمتقبل في وجود السكروز، ويتم الحصول على عائلتين رئيستين من المنتجات [١٠٧، ١٠٨]:

- تحتوي فقط روابط ألفا-١،٦ بالإضافة إلى رابطة ألفا-١،٤ للمالتوز (الموجود في النهاية الاختزالية).
- تحتوي على ١-٤ روابط ألفا-١،٦ ورابطة ألفا-١،٢ في النهاية غير الاختزالية (الشكل رقم ٤, ١٠).

يؤدي وجود روابط ألفا-١،٢ هذه إلى مقاومة عالية جداً لهجوم الإنزيمات الهضمية البشرية والحيوانية [١٠٩]. ولا يتم تمثيلها غذائياً بواسطة الفئران خالية الجراثيم [١١٠] ويتم تمثيلها على وجه الخصوص بواسطة البيفيدوباكتيريا، واللاكتوباسيلاي وأساساً البكتيريا العصوية [٧٤]. كما تم أيضاً ايضاح قدرتها على حث مجموعة واسعة من الإنزيمات الجليوكولية، بدون أي زيادة كبيرة في الإنتاج الثانوي للغازات، وعليه دون أي تأثير ضار [١١١].



الشكل رقم (٤ ,١٠). تركيب السكر الرباعي الجلوكوبيرانوزيل المرتبط برابطة ألفا-٢،١ (GOS). من [٧٤].

وقد أثبتت التجارب الميدانية على العجول أن اعطاء ١٥ ,٠٪ من سكريات الجلوكوأوليجو هذه في الأعلاف ينتج عنه خفض ٢٠٪ من التكاليف البيطرية [٧٤]. وللأسف، لم يتم اختبار هذا المنتج في التجارب على الإنسان وعليه يتم إنتاج فقط حوالي ٦٠ طن سنوياً، وذلك أساساً لتطبيقات مستحضرات التجميل البشرية [١١٢].

إلى جانب خصائص البريبيوتيك لها، فقد ثبت أن سكريات الجلوكوأوليجو المحتوية على روابط ألفا-٢،١ تمنع تطور مرض السكري من النوع ٢ في الفئران المغذاة بافراط [١١٣]. وتخضع هذه الخاصية المميزة جداً حالياً للدراسة المكثفة. ومن المستغرب، أن الديكستران سكريز المكون لرابطة ألفا-٢،١ من ليوكونوستوك ميزينتيرويديس NRRL B-1299 يمتلك موقعين للتحفيز بدلاً من موقعٍ واحد على عكس الجلوكان سكريزات الأخرى في عائلة محللات الجليكوسيدات ٧٠ [١١٤]. ويتميز هذا الإنزيم، كقاسم مشترك مع أعضاء العائلة ٧٠ الآخرين، بموقع تحفيز موجود في جزء النهاية النيتروجينية للإنزيم والذي يحفز تكوين روابط ألفا-٦،١ (تخليق الديكستران). ومع ذلك، فإن الموقع الثاني للتحفيز الموجود في منطقة النهاية الكربونية يكون في غاية التخصص لروابط ألفا-٢،١. ويؤدي هذا النشاط إلى تكوين ألفا-٢،١ ديكستران الراسمي.

وباستخدام تقنيات الهندسة الإنزيمية، تم اقتطاع الجين الأصلي المرمز للديكستران سكريز من ليوكونوستوك ميزينتيرويديس NRRL B-1299. وقد سمح هذا بتصميم إنزيم جديد لديه فقط مجال تحفيز واحد والذي يظهر نشاط مكون لرابطة ألفا-٢،١. ونشر هذا الإنزيم على الديكستران يسمح بالتطعيم التصميمي للراسيميات والذي يؤدي إلى تكوين مشتقتن جديدة للديكستران [١١٥].

(٥, ٢, ٣, ١٠) النشا المقاوم Resistant Starch

كان يعتقد لسنواتٍ عديدة أن النشا يتم هضمه بالكامل إلى الجلوكوز ومن ثم تمثيله غذائياً. ومع ذلك، فقد أظهرت الدراسات الحديثة أن جزءاً مهماً من النشا لا يهاجم بالإنزيمات الهضمية [١١٦، ١١٧]. ويصل هذا "النشا المقاوم" [١١٨] إلى الأمعاء الغليظة حيث يتم تمثيله غذائياً بواسطة البيئة البكتيرية. في هذا الصدد، يمكن اعتبار النشا المقاوم على أنه مركب بريبيوتيك ممتاز [١١٩-١٢١]. ويصف مصطلح "النشا المقاوم" في الأصل جزء النشا المتبقي السليم الذي يتم الحصول عليه بعد المعالجة الشاملة بالألفا-أميليز والبوليولانيز في المختبر [١٢٢]. ومع ذلك، فالتعريف الأكثر دقة هو الجزء من النشا الغذائي الذي ينجو من الهضم في الأمعاء الدقيقة المساوي للفرق بين النشا الكلي ومجموع النشا سريع الهضم والنشا بطيء الهضم [١٢٢].

يمكن تمييز أربعة أنواع من النشا المقاوم (RS) [١١٨]:

- RS_1: النشا الذي لا يمكن الوصول إليه فيزيائياً مثل ذلك الموجود في الحبوب والبذور والبقوليات الكاملة غير المعاملة. وهو ثابت حرارياً ويستخدم كمكون في الأطعمة التقليدية.
- RS_2: نشا في شكل حبيبات (حبيبات النشا الخام)، مثل النشا في البطاطس غير المطبوخة أو الموز الأخضر. ويتم هضمه ببطء وبشكلٍ غير كامل في الأمعاء الدقيقة.
- RS_3: الأميلوز المتحلل المتكون بعد الطبخ والتبريد، كما هو الحال في الخبز، رقائق الذرة، والبطاطس المطبوخة والمبردة. وهو جزء النشا الأكثر مقاومة.
- RS_4: يتم الحصول عليه بالتحوير الكيميائي للنشا، مثل إستر الفوسفات ثنائي النشا.

تؤثر تقنيات المعالجة كثيراً على تكوين النشا المقاوم. يحتوي دقيق الحبوب المجهز للغاية على مستويات من النشا المقاوم (حوالي ١,٥٪ وزن/ وزن) أقل بكثيرٍ من الفاصوليا، على سبيل المثال (ما يقرب من ٦٠٪ وزن/ وزن). وتزيد التقنيات مثل القذف المتبوع بالتبريد [١٢٣]، وطبخ البقوليات بالبخار [١٢٤]، وتعقيم نشا القمح [١٢٥]، وسلق الأرز [١٢٦]، والخبز [١٢٧]، والتحليل الحراري لفول الليما (فاصيلوس لوناتاس) [١٢٨] من محتوى المواد الغذائية من النشا المقاوم.

ويمكن أيضاً استخدام المعالجة الإنزيمية لإعداد النشا المقاوم. فيسمح عمل الألفا-أميليز على النشا الخام بتحلل جزء النشا غير المقاوم وعليه ينتج عنه تحضير نشا غني بالنشا المقاوم [١٢٩]. وبالمثل، فإن عمل الألفا-أميليز الثابت حرارياً على النشا المعزول من البازلاء ينتج جزءاً يحتوي على ٧٠٪ وزن/ وزن من النشا المقاوم [١٣٠]. والاحتمال الآخر هو استخدام إنزيم مفكك للتفرعات لتحليل روابط ألفا-١،٦ في الأميلوبكتين. وتنتج هذه المعالجة الأميليز، مما يكون حبيبات النشا المقاوم عند التسخين عن طريق تفاعل

تـحللي [١٣١]. وينطوي نهج مماثل علـى عمل البوليولانيز علـى النشويات منخفضة الأميلوز مثل نشا الأرز ودقيق الأرز [١٣٢].

يمكن تصنيع سلاسل أميلوز عالي النقاء مباشرةً من السكروز باستخدام ترانس جلوكوسيديز، مثل الأميلوسكريز من النيزيريا بولي ساكاريا [١٣٣، ١٣٤]. ويحفز هذا الإنزيم التفاعل التالي:

$$\underset{\text{sucrose}}{n\ \text{Glc-Fru}} \xrightarrow{\text{amylosucrase}} \underset{\text{amylose}}{(\alpha\text{-1,4-D-Glc})_{n-1}\text{-D-Glc}} + n\ \text{D-Fru}$$

ينتمي الأميلوسكريز إلى العائلة ١٣ في نظام تصنيف محللات الجليكوسيد [١٣٥]، والتي تعرف أيضاً باسم "عائلة ألفا-أميليز". وقد تم تحديد تركيبها ثلاثي الأبعاد وحتى الآن فإن هذا هو التركيب الوحيد المتاح للجلوكان سكريز. وتم توضيح آلية عمل الأميلوسكريز على المستوى الجزيئي [١٣٦] وتوصيف منتجات استطالة الألفا-جلوكانات [١٣٧] ومنتجات الأميلوز [١٣٨].

وتـطـور شركـة Südzucker حالياً إنتـاج النشا المقاوم باستخـدام الأميلوسكريز. والـمنتج التجاري هو NEO-amylose® [١٣٩].

للحصول على الفوائد الصحية للنشا المقاوم، فإن الاستهلاك اليومي الموصى به هو ٢٠ جرام. تحتوي البقوليات مثل الفاصوليا السوداء على محتوى عالي من النشا المقاوم (٦٣٪ وزن/ وزن). وقد ثبت أن استهلاك النشا المقاوم يعزز من أكسدة الدهون. ويزيد استبدال ٤,٥٪ من إجمالي الكربوهيدرات الغذائية بالنشا المقاوم من أكسدة الدهون بعد الوجبات في عينة من أفراد ١٢ دراسة بنسبة ٢٣٪، وعليه يمكن أن يقلل من تراكم الدهون على المدى الطويل [١٤٠]. ومع ذلك، فقد كشفت هذه الدراسة أيضاً أنه قد يكون هناك تأثير أقصى لإضافة النشا المقاوم إلى النظام الغذائي وأن الإضافة أكثر من هذا الحد لا تمنح أي فوائد أيضية أو تغيير من الوجبة المحتوية على صفر٪ من النشا المقاوم.

وقـد تم وصف إنتاج مـجموعة واسعة من سكريات البيتا-جليكوأوليجو [١٤١]. ومعظمها غير تنافسي من الناحية التجارية، حتى لو تم إثبات الاهتمام المحتمل لها علـى نطاق المختبر. ويؤدي عـمل البيتا-جلوكوسيديز على محلول جلوكوز مركز (٧٠٪، وزن/ وزن) إلى تخليق سكريات البيتا-جلوكوأوليجو [١٤٢]، أساساً سكريات ثنائية وثلاثية تـحتوي على روابط بيتا-٦،١ (جينتيوبيوز وجينتيوتريوز) وبيتا-٤،١ (سيلوبيوز وسيلوتريوز).

ويمكن استخـدام التحليل الإنزيمي أو الحراري لزيلانات النبات لإنتاج سكريات بيتا-زيلوأوليجو [١٤٣، ١٤٤]، التي توجد أيضاً بشكلٍ طبيعي فـي سيقان الخيزران [١٤٥]. ومع ذلك، عندما تستخدم

الزيلانيزات الداخلية، فإن درجة التحليل تتأثر بدرجة كبيرة بوجود سلاسل الأرابينوفيورانوزيل الجانبية في بوليمر الزيلان [١٤٦]. وفي الوقت الحاضر يقتصر التوزيع التجاري لسكريات الزيلوأوليجو (XOS) كإضافات غذائية على آسيا، حيث تبيع شركة سانتوري المتحدة الكثير من منتجات الـ XOS. وتجرى الأبحاث، ولكن، على آثار البريبيوتيك للـ XOS وأظهرت الكثير من الدراسات أنها تؤثر إيجابياً في نمو البيفيدوباكتيريا وربما اللاكتوباسيلاي [١٤٧، ١٤٨].

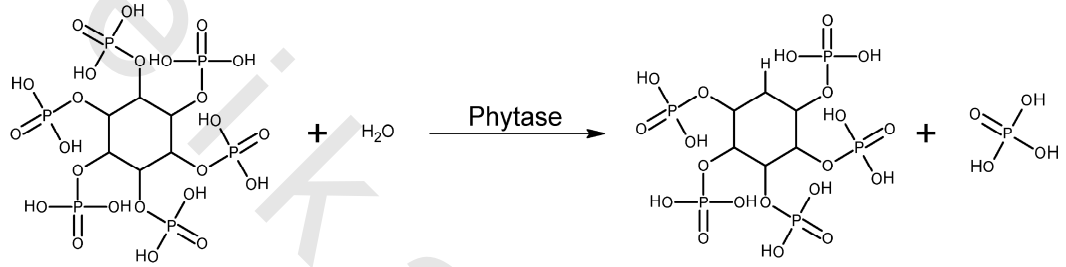
(١٠ ,٤) تطبيقات الأعلاف Feed Applications

ينتشر استخدام الإنزيمات الخارجية في تربية الحيوانات من أجل تحسين القيمة الغذائية للأعلاف على نطاقٍ واسع ومستمر منذ ثمانينيات القرن الماضي. وتستخدم حالياً مجموعة من كلٍ من الإنزيمات المحللة للكربوهيدرات (كربوهيدريزات) والفيتيزات وقد حصل حوالي ٤٠ منتجاً للإنزيمات على موافقة الاتحاد الأوروبي النهائية. ويقدر السوق الشامل لإنزيمات الأعلاف بحوالي ٢٧٠ مليون يورو.

(١٠ ,٤ ,١) تحليل الفيتات Phytate Hydrolysis

حمض الفيتيك أو الميو-إينوزيتول هيكساكي فوسفات (IP6) هو مكون واسع الانتشار وثابت ضد الحرارة والأحماض لمعظم الأعلاف والمواد الغذائية المشتقة من النبات، بما في ذلك الحبوب، والمكسرات، والبذور (الشكل رقم ٥ ,١٠). والـ IP6 هو حاجب قوي لمختلف الكاتيونات بما في ذلك الماغنيسيوم$^{+2}$، والكالسيوم$^{+2}$، والحديد$^{+2}$، والزنك$^{+2}$، والتي هي عناصر غذائية مهمة في الوجبات الغذائية البشرية والحيوانية. وبسبب هذا، وحقيقة أن الـ IP6 يمكن أن يكون متراكبات مع البروتينات والمعادن، فإن الـ IP6 يعدُّ في كثيرٍ من الأحيان عاملاً مضاداً للتغذية لكلٍ من الحيوانات والبشر. ومع ذلك، فإن الـ IP6 يعد أيضاً مصدراً وافراً من الفوسفات، العنصر الحاسم في الكثير من الجزيئات الحيوية المهمة ولذلك فهو مركب أساسي لجميع الحيوانات، بما في ذلك البشر. للأسف، في حين يمكن للحيوانات المجترة تحرير الفوسفات المخزنة في الـ IP6 من خلال النشاط الميكروبي في قنواتها الهضمية، فإن الدواجن، والخنازير، والبشر (بين غيرها) يمكنها فقط الاستفادة منه بدرجة ضعيفة للغاية لأنها تفتقر إلى الإنزيمات المناسبة. وهناك نتيجتان رئيستان لهذا النقص النسبي. أولاً، يكون الفوسفات المخزن في الـ IP6 غير متوفر للدواجن والخنازير، وهو ما يعني أنه في حالة تربية الحيوانات، فإن تكملة النظام الغذائي بمصدر فوسفات بديل تكون مرغوبة. ثانياً، حيث إن الـ IP6 يبقي غير مهضوم، فإن تربية الخنازير والدواجن المكثفة تعدُّ مصدراً مهماً للتلوث، حيث إن النفايات الغنية بالفوسفات المرتبطة بها تؤدي إلى تلوث المياه وزيادة المواد المغذية.

تشكل الفيتيزات فئة إنزيم الأعلاف الوحيدة الأكثر أهمية حيث تأخذ حوالي ٦٠-٧٠٪ من سوق الإنزيمات. والفيتيزات أو الميو-إينوزيتول هيكساكي فوسفات فوسفوهيدروليزات هي فوسفاتيزات متخصصة تحفز نزع الفوسفات المتتابع من الـ IP6. وقد تم عزل الفيتيزات من مجموعة متنوعة من المصادر بما في ذلك النباتات والحيوانات، وعلى وجه الخصوص، الكائنات الدقيقة [١٤٩-١٥٤]. يتضمن تصنيف الـ IUBMB للإنزيمات ثلاث مجموعات من الفيتيزات (EC 3.1.3.8, 26, 72)، ولكن يشار عموماً في المراجع إلى الإنزيمات EC 3.1.3.8 و٢٦ على أنها مجموعات الفيتيزات الرئيسة؛ كما أعطي EC 3.1.3.2 (فوسفاتيز حمضي واسع التخصصية) أيضاً اسم الفيتيز.



الشكل رقم (٥, ١٠). التفاعل الجيني المحفز بالفيتيزات.

والفيتيز الأول الذي تم تسويقه تجارياً كان فوسفاتيز حمض الهيستيدين من الأسبرجيلس نيجر NRRL3135، ولكن عادة ماتكون الإنزيمات الداخلة حديثاً إلى السوق من أصل بكتيري. وحالياً يقارب سوق الفيتيز ما قيمته ١٥٠ مليون يورو [١٥٥] ويهيمن عليه مستحضرات ثلاثة إنزيمات رئيسة: Natuphos (BASF، لودفيجسهافن) ٣-فيتيز (EC 3.2.1.8) ينتج بواسطة أسبرجيلس نيجر CBS 114.94، Phyzyme (دانيسكو لتغذية الحيوان) ٦-فيتيز مؤتلف (EC 3.2.1.26) أساساً من إيشيريشيا القولون، و Ronozyme (DSM، بازل)، ٦-فيتيز مؤتلف (EC 3.2.1.26) أساساً من بينيوفورا ليسيي [١٥٦].

تؤدي الفيتات عند إضافتها إلى أعلاف الدواجن إلى انخفاض إجمالي محتوى الفوسفات في الفضلات، وزيادة إنتاج البيض وكتلة البيض، وزيادة محتوى العظام المعدني ووزن جسم الحيوان. وبالمثل، عن طريق تقليل الحاجة إلى الفوسفات التكميلي، فإن إضافة الفيتات الخارجية إلى وجبات الخنازير الغذائية تؤدي إلى خفض تركيز الفوسفات الإجمالي والقابل للذوبان في المياه في الفضلات وتحسن قوة العظام.

من حيث التقنية الحيوية، كانت الفيتيزات موضوع الكثير من البحوث التي هدفت أساساً إلى إنتاج الإنزيمات الثابتة حرارياً. وقد تم اعتماد منهجين رئيسين: استكشاف التنوع الحيوي للفيتيزات الطبيعية الثابتة حرارياً [١٥٧-١٦١] وهندسة البروتين [١٦٢-١٦٤].

وقد أدى التقدم في التقنية الحيوية أيضاً إلى نشوء محاولات لهندسة الحيوانات والنباتات [١٦٥] لإنتاج الفيتيز. وبالمثل، وصف جولوفان وزملاؤه إنتاج فيتيز من إيشيريشيا القولون في الغدد اللعابية للخنازير [١٦٦]. وعلى الرغم من أن هذه الدراسة وفرت توضيحاً أنيقاً لفعالية هذه الإستراتيجية للحد من كلٍ من متطلبات الفوسفات غير العضوي ومحتوى الفضلات من الفوسفات، إلا أنه من غير الواضح حالياً ما إذا كانت القضايا الأخلاقية المحيطة بهذا النهج سوف تسمح بتنفيذه في المستقبل [١٦٧].

(٢, ٤, ١٠) تحليل الكربوهيدرات Carbohydrate Hydrolysis

السكريات العديدة غير النشوية (NSPs) هي مجموعة غير متجانسة من البوليمرات التي، عندما تؤخذ معاً، تشكل مصدراً وفيراً للغاية من الألياف الغذائية. في تغذية الحيوان، هناك ثلاثة أنواع رئيسة من NSP ذات أهمية خاصة: (١) بيتا-١،٣-١،٤ جلوكانات، التي هي مألوفة في غلاف وسويداء الحبوب مثل الشعير، (٢) والأرابينوزيلانات (AXs) ، أيضاً منتشرة في الحبوب، و(٣) المانانات (خاصةً جالاكتومانانات) التي تنتشر في بذور النباتات البقولية وهي عنصر مهم من وجبة فول الصويا وفول الجوار [١٦٨].

وعندما تستخدم لعلاج علف الحيوانات، فإن التأثير الرئيس للكربوهيدرات يكون هو الحد من لزوجة الهضامة [١٦٩]. ومع ذلك، فإن النتيجة الأساسية لهذا العمل هي انخفاض حدوث النفايات الرطبة وزيادة في هضم المواد الغذائية [١٧٠، ١٧١]. في الدجاج اللاحم، يزيد العلاج الإنزيمي بنظام غذائي قائم على القمح من توافر الطاقة التمثيلية [١٧٢، ١٧٣]، وفي حالة وضع الدجاج البياض، فإنه يحسن أداء التبييض [١٧٤].

في اطار الحظر الأوروبي لمنشطات النمو المحتوية على المضادات الحيوية في أعلاف الحيوانات، فمن المهم أن نلاحظ أن الكربوهيدرات أيضاً تعطي آثاراً مفيدة في الواجهات بين النظام الغذائي، والبيئة المعوية الدقيقة، والجراثيم الداخلية [١٧٥].

ويتعلق استخدام الإنزيمات الخارجية المحللة للكربوهيدرات، أو الكربوهيدريزات أساساً بالحيوانات وحيدة المعدة مثل الدواجن، وإلى حدٍ أقل، الخنازير. وحالياً، تستخدم عدة أنواع من الإنزيمات:

- **زيلانيزات بيتا-١،٤ الداخلية، المعروفة أكثر باسم الزيلانيزات (EC 3.2.1.8)**: تزيل بلمرة الأرابينوزيلانات وهي المكونات الرئيسة النشطة للتحضيرات التجارية مثل Natugrain (BASF، لودفيجسهافن، ألمانيا) المستخدمة لتحسين وجبات الديك الرومي.
- **١،٤-بيتا-دي-جلوكان ٤-جلوكانوهيدروليزات (EC 3.2.1.4)، و١،٣-بيتا-دي-جلوكان ٣-جلوكانوهيدروليزات (EC 3.2.1.39)، وبوجهٍ خاص ١،٣-١،٤-بيتا-جلوكانيزات (EC 3.2.1.73) أو ليشينيزات:**

هذه هي الإنزيمات الرئيسة المحللة للجلوكان التي تعمل على ١،٣-٤،١-بيتا-جلوكانات مثل تلك التي توجد في الحبوب وخاصةً الشعير (هورديوم فولغاري) والشوفان (أفينا ساتيفا). في تطبيقات الأعلاف، تكون الجلوكانيزات (المرتبطة بالزايلانيزات) هي المكونات النشطة لمنتجات مثل Endofeed وEndofeed W (شركة GNC Bioferm، ساسكاتون، كندا) التي تستخدم لتحسين الوجبات الغذائية اعتماداً على الشوفان/ الشعير والقمح /التريتيكال/ الجاودار على التوالي.

- **بيتا-دي-مناناينزات (منان إندو-١،٤-بيتا-مانانوسيديزات، EC 3.2.1.78)**: يقتصر الاستخدام التجاري لهذه الإنزيمات على قطاع أعلاف الحيوانات، حيث تستخدم تحضيرات مثل Hemicell (ChemGen Corp) لرفع امكانيات الطاقة التمثيلية لوجبات فول الصويا وفول الجوار [١٧٦-١٧٨].

والكثير من منتجات إنزيمات الأعلاف هي في الواقع مزيج من أنواع الإنزيمات أعلاه. وأحد الأمثلة على ذلك هو Rovabio™ Excel (أديسيو، أنتوني، فرنسا) وهو مزيج من سلالة بنسيليوم فونيكولوزوم (Rovabio™ Excel)، وهو خليط من إندو-١،٤-بيتا-زيلانيزات، وإندو-١،٣ (٤)-بيتا-جلوكانيزات، والبكتينيزات والمناينزات. أظهرت دراسات المختبر باستخدام نموذج للجهاز الهضمي (حركية TNO، والنظام متعدد الأجزاء للمعدة والأمعاء الدقيقة: TIM-1) أن هذا المستحضر فعال بصفةٍ خاصة لإذابة أرابينوزيلانات القمح غير القابلة للذوبان [١٧٩].

وفيما يتعلق بتحسين كربوهيدرات الأعلاف، تم استعراض المعايير الرئيسة [١٧٠، ١٧٥، ١٨٠، ١٨١]. وتشمل هذه تطوير طرق تحليل أكثر حساسية وأكثر دقة، وتعريف وتوصيف أفضل لوسائط التفاعل، ومزيد من تطوير الإنزيمات المتحملة للحرارة (للحد من فقد الطبيعة الإنزيمية خلال تكون الحبيبات) وفهم أكبر للمنتجات النهائية للتحليل الإنزيمي من أجل فهم وتوثيق آثارها المفيدة على البيئة المعوية الدقيقة.

(٣, ٤, ١٠) إنتاج الأحماض الأمينية Amino Acid Production

يستهدف إنتاج التقنية الحيوية من الأحماض الأمينية الأسواق الغذائية (٣٢٪ في عام ٢٠٠٤م)، والأعلاف (٥٦٪)، والمواد الكيميائية الدقيقة (١٢٪) [١٨٢] ويوازي ما قيمته الإجمالية ٤,٥ مليار دولار أمريكي في عام ٢٠٠٤م. والأحماض الأمينية هي وحدت بناء البروتينات. وحيث إن هناك حاجة إليها في صورة إل- في معظم الحالات، فإن الإنتاج الميكروبي هو أفضل اختيار بشكلٍ عام. والاستثناء الوحيد هو الميثيونين، الذي يتم تصنيعه كيميائياً كخليط راسمي دي، إل من الأكرولين، وحمض الهيدروسيانيك، وميثيل الميركابتان، والأمونيا. وفي الواقع، يمتلك البشر والحيوانات نظام إنزيمات مؤكسدة/ ناقلة لمجموعة الأمين قادر

على تـحويل دي-ميثيونين إلى إل-ميثيونين. إن توازن الأحماض الأمينية هو أمـر حيوي لتغذية كلٍ من الإنسان والحيوان، حيث إن تسعة منهم ضرورية (أي، لا يمكن تخليقها بالتمثيل الغذائي للحيوانات العليا): الليسين، والثريونين، والميثيونين، والتربتوفان، والليوسين، والأيزوليوسين، والفالين، والهيستيدين، والفينيل ألانين [١٨٣]. وثلاثة أحماض أمينية هـي مهمة لتطبيقات الـمواد الغذائية: حمض إل-جلوتاميك، وحمض إل-أسبارتيك، وإل-فينيل الأنين. وحمض إل-جلوتاميك هو أكثر الأحماض الأمينية إنتاجية (١,٥ مليون طن في السنة). وتتم صناعته، فـي شكل الجلوتامات أحادية الصوديوم (MSG)، باستخدام سلالة الكوراينيباكتريوم جلوتاميكوم. ويتم استخدام الـ MSG الناتج كمحسن للنكهة [١٨٤]. وقـد درست هندسة الأيض الحيوي لتخليق الجلوتامات من كلوستريديوم جلوتاميكوم [١٨٥] وتم اكتشاف الجينوم لهذا الكائن الدقـيق ذي الأهمية الصناعية البالغة بالكامل [١٨٦]. ويستخدم حمض إل-أسبارتيك وإل-فينيل ألانين لتخليق الأسبارتام مكثف التحلية (إستر الميثيل إل-أسبرتيل-إل-فينيل ألانيل). ويتم إنتاج حمض إل-أسبارتيك باستخدام إنزيم أسبارتيز، الذي يـحفز إضافة الأمونيا إلى حمض الفيوماريك [١٨٧]، فـي حين يتم الحصول على إل-فينيل ألانين من سلالات إيشيريشيا القولون.

يمكن الحصول على الأسبارتام، الذي يتم إنتاجه حالياً بمستوى حوالي ١٥٠٠٠ طن في العام بالإقتران الإنزيمي المباشر لحمض الأسبارتيك المحمي بإن-فورميل مع إستر الميثيل إل-فينيل ألانين والمحفز بالثيرموليسين في تفاعل انتقائي فراغي وللمجسمات على حدٍ سواء [١٨٨].

وفيما يتعلق بأعلاف الحيوان، فإن الأحماض الأمينية الأساسية المستخدمة هي إل-ليسين، ودي،إل-ميثيونين، وإل-ثريونين، وإل-تربتوفان. وبلغ إنتاج إل-ليسين، الحمض الأميني الأول المحدد لتربية الخنازير والثاني، بعد الميثيونين، للدواجن، ٨٥٠٠٠٠ طن فـي عام ٢٠٠٥م [١٨٢] باستخدام الكوراينيباكتريوم جلوتاميكوم [١٨٩]. وكما سبق ذكـره، خضعت هذه السلالة للهندسة الأيضية من أجل الحصول على تحسينات فـي الأداء [١٩٠]. وكان إل-ثريونين أول حمض أميني يتم إنتاجـه باستخدام سـلالـة إيشيريشيا القولون المؤتلفة [١٩١]. ويقترب مستـوى الإنتاج الحالي مـن ٨٠٠٠٠ طن فـي السنة. وينتج إل-تربتوفان أيضاً بما يـقرب مـن ١٠٠٠٠ طن سنوياً باستخدام سلالات إيشيريشيا القولون والكوراينيباكتريوم جلوتاميكوم المؤتلفة [١٩٢].

وبالنسبة للأحماض الأمينية الأخـرى ونظائر الأحماض الأمينية، غالباً ما يتم استخدام التفاعلات الإنزيمية [١٩٣]. وقـد تم إنجاز العمل الرائد فـي هذا الـمجال من قبل أي شيباتا في تانابي سيياكو، اليابان، وذلك باستخدام إل- أو دي-أسيليز لتحويل دي، إل-إن-أسيتيل الحمض الأميني إلى إل- أو دي-الحمض الأميني، على التوالي، مع راسمية موازية للمصاوغة غير المحورة [١٩٤]. وتستخدم شركة ديجوسا الأسيليز من

الأسبرجيلس أوريزي لإنتاج عدة مئات الأطنان من إل-ميثيونين وإل-فالين. ويستخدم الإنزيم في مفاعل الغشاء المستمر من أجل تقليل استهلاك الإنزيم [١٩٥].

المراجع References

[١] Godfrey, T. and West, S. (1996) *Industrial Enzymology*, 2nd edn, Macmillan Press, London.

[٢] Norman, B.E., Pedersen, S., Bisgaard-Fransen, H., and Borchert, T.V. (1997) The development of a nex heat-stable alpha-amylase for calcium free starch liquefaction. *Starch/Stärke*, **49,** 371-379.

[٣] Bisgaard-Fransen, H., Svendsen, A., Norman, B., Pedersen, S., Kjaerulff, S., Outtrup, H., and Borchert, T.V. (1999) Development of industrially important a-amylases. *J. Appl. Glycosci.*, **46,** 199-206.

[٤] Nazmi, A.R., Reinisch, T., and Hinz, H.J. (2006) Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α-amylase (BLA). *Arch. Biochem. Biophys.*, **453,** 18-25.

[٥] Viksø-Nielsen, A., Andersen, C., Hoff, T., and Pedersen, S. (2006) Development of new α-amylases for raw starch hydrolysis. *Biocatal. Biotransformation*, **24,** 121-127.

[٦] Latorre-Garcia, L., Adam, A.C., Manzanares, P., and Polaina, J. (2005) Improving the amylolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* glucoamylase by the addition of a starch binding domain. *J. Biotechnol.*, **118,** 167-176.

[٧] Dalgleish, D.G. (1993) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. **1,** 2nd edn (ed. P.F. Fox), Chapman and Hall, London, pp. 69-100.

[٨] Wigley, R.C. (1996) *Industrial Enzymology*, 2nd edn, Chapter 2.7 (eds T. Godfrey and S. West), Macmillan Press Ltd, London.

[٩] Aehle, W. (2004) *Enzymes in Industry*, 2nd edn, Chapter 5, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[١٠] West, S. (1996) *Industrial Enzymology*, 2nd edn, Chapter 2.12 (eds T. Godfrey and S. West), Macmillan Press Ltd, London.

[١١] Nelson, J.H., Jensen, R.G., and Pitas, R.E. (1976) Pregastric esterase and other oral lipases-a review. *J. Dairy Sci.*, **60,** 327-331.

[١٢] Cunningham, F.E., Proctor, V.A., and Goetsch, S.J. (1991) Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. *World's Poult. Sci. J.*, **47,** 141-163.

[١٣] Crawford, R.J.M. (1987) The use of lysozyme in the prevention of late blowing in cheese. *Bull. Int. Dairy Fed.*, **216,** 2-16.

[١٤] Dickinson, E. (1997) Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial utilization. *Trends Food Sci. Technol.*, **8,** 334-340.

[١٥] Lorensen, P.C. and Schlimme, E. (1998) Properties and potential fields of application of transglutaminase preparations indairying. *Bull. Int. Dairy Fed.*, **332,** 47-52.

[١٦] Vesa, H.T., Marteau, P., and Korpela, R. (2000) Lactose intolerance. *J. Am. Coll. Nutrit.*, **19,** 165S–167S.

[١٧] Roy, I. and Gupta, M.N. (2003) Lactose hydrolysis by Lactozym TM immobilized on cellulose beads in batch and fl uidized bed modes. *Process Biochem.*, **39,** 325-332.

[١٨] Fujita, K., Hara, K., Hashimoto, H., and Kitahata, S. (1990) Transfructosylation catalysed by β-fructofuranosidase I from Arthrobacter sp. K-1. *Agric. Biol. Chem.*, **54,** 2655-2661.

[١٩] Kawase, M., Pilgrim, A., Araki, T., and Hashimoto, K. (2001) Lactosucrose production using a simulated moving bed reactor. *Chem. Eng. Sci.*, **56,** 453-458.

[٢٠] Novalin, S., Neuhaus, W., and Kulbe, K.D. (2005) A new innovative process for to produce lactose-reduced skim milk. *J. Biotechnol.*, **119,** 212-218.

[٢١] Schoch, T.J. (1965) Starch in bakery products. *Baker's Dig.*, **39,** 48-57.

[٢٢] Zobel, H.F. and Kulp, K. (1996) *Baked Goods Freshness, Technology, Evaluation, and Inhibition of Staling*, Chapter 1 (eds R.E. Hebeda and H.F. Zobel), Marcel Dekker, New York.

[٢٣] Christophersen, C., Otzen, D.E., Norman, B.E., Christensen, S., and Schäfer, T. (1998) Enzymatic characterization of Novamyl®, a thermostable α-amylase. *Starch*, **50,** 39-45.

[٢٤] Schäfer, T., Borchert, T.W., Nielsen, V.S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L.D., Salmon, S., Pedersen, S., Heldt-Hansen, H.P., Poulsen, P.B., Lund, H., Oxenbøll, K.M., Wu, G.F., Pedersen, H.H., and Xu, H. (2007) *Industrial Enzymes*, vol. **105,** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 59-131.

[٢٥] Morgan, K.R., Hutt, L., Gerrard, J., and Every, D. (1997) Stalingin starch breads: the effect of antistaling α-amylase. *Starch*, **49,** 54-59.

[٢٦] Courtin, C.M. and Delcour, J.A. (2001) Relative activity of endoxylanases towards water extractable and water unextractable arabinoxylan. *J. Cereal Sci.*, **33,** 301-312.

[٢٧] McCleary, B.V. (1986) Enzymatic modification of plant polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.*, **8,** 349-354.

[٢٨] Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Santos da Selva, M.J., Bosse, M., Egmond, M.R., Hagemansin, M.L.D., Visser, J., Beldman, G., Kusters-vanSomeren, M.A., and Voragen, A.G.J. (1992) *Xylans and Xylanases*, Elsevier, Amsterdam, pp. 349-360.

[٢٩] Sarwin, R., Laskawy, G., and Grosch, W. (1998) Changes in the levels of glutathione and cysteine during the mixing of doughs with L-threo and D-erythro-ascorbic acid. *Cereal Chem.*, **70,** 553-557.

[٣٠] Poulsen, C. and Høstrup, P.B. (1998) Purifi cation and characterization of a hexose oxidase with excellent strengthening effects in bread. *Cereal Chem.*, **75,** 51-57.

[٣١] Szalkucki, T. (1993) *Enzymes in Food Processing*, 3rd edn (eds T. Nagodawithana and G. Reed), Academic Press, New York, pp. 279-291.

[٣٢] Hammer, F.E. (1993) *Enzymes in Food Processing*, 3rd edn (eds T. Nagodawithana and G. Reed), Academic Press, New York, pp. 221-277.

[٣٣] http://www.dsm.com/le/en_US/bake/html/technology.htm. Accessed 25 January 2010.

[٣٤] Vandamme, E.J., Renard, C.E.F.G., Arnaut, F.R.J., Vekemans, N.M.F., and Tossut, P.P.A. (1997) Process for obtaining improved structure build-up of baked products, European Patent 0 790 003 B1.

[٣٥] Lacaze, G., Wick, M., and Cappelle, S. (2007) Emerging fermentation technologies: development of novel sourdoughs. *Food Microbiol.*, **24,** 155-160.

[٣٦] Scheffler, A. and Bamforth, C.W. (2005) Exogenous β-glucanases and pentosanases and their impact on mashing. *Enzyme. Microb. Technol.*, **36,** 813.

[٣٧] McElroy, D. and Jacobsen, J. (1995) What's brewing in barley biotechnology? *Bio/technology*, **13,** 245-249.

[٣٨] Oh, H., Hoff, J.E., Armstrong, G., and Haff, L.A. (1980) Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J. Agric. Food Chem.*, **28,** 394-398.

[٣٩] Siebert, K.J. and Lynn, P.Y. (1997) Mechanisms of beer colloidal stabilization. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **55,** 73-78.

[٤٠] Bamforth, C.W. (1999) Beer haze. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **57,** 81-90.

[٤١] O'Rourke, T. (1996) *Industrial Enzymology* (eds T. Godfrey and S. West), Macmillan Press Ltd, London, pp. 103-131.

[٤٢] Asano, K., Shinagawa, K., and Hashimoto, N. (1982) Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill-haze formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **40,** 147-154.

[٤٣] Siebert, K.J. (1999) Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **47,** 353-362.

[٤٤] Lopez, M. and Edens, L. (2005) Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.*, **53,** 7944-7949.

[٤٥] Barrett, A.J. and Rawlings, N.D. (1992) Oligopeptidases and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **373,** 353-360.

[٤٦] Edens, L., Dekker, P., van der Hoeven, R., Deen, F., de Roos, A., and Floris, R. (2005) An extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates . *J. Agric. Food Chem.*, **53,** 7950-7957.

[٤٧] Posada, J., Almenar, J., and Galindo, J. (1971) A practical approach on protein stabilizers. *Proc. Eur. Brew. Conv.*, **13,** 379-391.

[٤٨] Jayani, R.S., Saxena, S., and Gupta, R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.*, **40,** 2931.

[٤٩] de Vries, R.P. and Visser, J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65,** 497-522.

[٥٠] Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., and Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.*, **77,** 215.

[٥١] Moreno-Arribas, M.V. and Polo, M.C. (2005) Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45,** 265-286.

[٥٢] Sarry, J.-E. and Gunata, Z. (2004) Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.*, **87** (4), 509.

[٥٣] Cebollero, E., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L., and Gonzalez, R. (2007) Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine? *Biotechnol. Lett.*, **29,** 191.

[٥٤] FAO/WHO (2001) Evaluation of health and nutritional properties of prebiotics in food, including powder milk with live lactic acid bacteria, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, Expert Consultation Report.

[٥٥] Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.H., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101,** 15718-15723.

[٥٦] Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauff, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delm é e, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.F., Gibson, G.R., Casteilla, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C., and Burcelin, R. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, **56,** 1761-1772.

[٥٧] Walker, R. and Buckley, M. (2006) Probiotic microbes: the scientifi c basis, Report of the American Academy of Microbiology.

[٥٨] Tannock, G.W. (1999) *Probiotics: A Critical Review*, Horizon Scientific Press, Wymondham, p. 1.

[٥٩] Szajewska, H., Kotowska, M., Mrukowicz, J.Z., Armanska, M., and Mikokajczyk, W. (2001) Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J. Pediatr.*, **138,** 361-365.

[٦٠] Van Niel, C.W., Feudtner, C., Garrison, M.M., and Christakis, D.A. (2002) *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics*, **109,** 678-684.

[٦١] Kotowska, M., Albrecht, P., and Szajewska, H. (2005) *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **21,** 583-590.

[٦٢] Correa, N.B., Perret Filho, L.A., Penna, F.J., Lima, F.M., and Nicoli, J.R. (2005) A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J. Clin. Gastroenterol.*, **39,** 385-389.

[٦٣] Figuereido, P.P., Vieria, E.C., Nicoli, J.R., Nardi, R.D., Raibaud, P., Duval-Ifl ah, Y., and Penna, F.J. (2001) Infl uence of oral inoculation with plasmid-free human *Escherichia coli* on the frequency of diarrhea during the first year of life in human newborns. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **33,** 70-74.

[٦٤] Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzochi, G., Poggioli, G., Miglioli, M., and Campieri, M. (2000) Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, **119,** 305-309.

[٦٥] Gionchetti, P., Morselli, C., Rizzello, F., Romagnolli, R., Campieri, M., Poggioli, G., Laureti, S., Ugolini, F., and Pierangeli, F. (2004) Management of pouch dysfunction or pouchitis with an ileoanal pouch. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **18,** 993-1006.

[٦٦] O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F., and Quigley, E.M.M. (2005) *Lactobacillus* and *Bifi dobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profi les. *Gastroenterology*, **128,** 541-551.

[٦٧] Hoesl, C.E. and Altwein, J.E. (2005) The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. *Eur. Urol.*, **47,** 288-296.

[٦٨] Castagluiuolo, I., Fiegler, M.F., Valenick, L., LaMont, J.T., and Pothoulakis, C. (1999) *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.*, **67,** 302-307.

[٦٩] Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, S.D., Michaelsen, K.F., Jeppesen, D.L., Valerius, N.H., and Paerrogaard, A. (2003) Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111,** 389-395.

[٧٠] Nurmi, E. and Rantala, M. (1973) New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nat. Lond.*, **241,** 210-211.

[٧١] Kullen, M.J. and Klaenhammer, T.R. (1999) *Probiotics: A Critical Review,* Chapter 6 (ed. G.W. Tannock), Horizon Scientific Press, Wymondham.

[٧٢] Steidler, L. and Neirynck, S. (2005) *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects,* Chapter 7 (ed. G.W. Tannock), Caister Academic Press, Wymondham.

[٧٣] Gibson, R.L. and Robertfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, **125,** 1401-1412.

[٧٤] Monsan, P.F. and Paul, F. (1995) *Biotechnology in Animal Feed and Animal Feeding,* Chapter 11 (eds R.J. Wallace and A. Chesson), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[٧٥] Yun, J.W., Park, J.P., Song, J.P., Lee, C.Y., Kim, J.H., and Song, S.K.Continuous production of inulo-oligosaccharides from chicory juice by immobilized endoinulinase. *Bioprocess Eng.*, **22,** 189-194.

[٧٦] Rocha, J.R., Catana, R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S., and Fernandes, P. (2006) Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chem.*, **95,** 77-82.

[٧٧] Gonzalez Diaz, E., Catana, R., Ferreira, B.S., Luque, S., Fernandes, P., and Cabral, J.M.S. (2006) Towards the development of a membrana reactorfor enzymatic inulin hydrolysis. *J. Membr. Sci.*, **273,** 152-158.

[٧٨] Catana, R., Eloy, M., Rocha, J.R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S., and Fernandes, P. (2007) Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chem.*, **101,** 260-266.

[٧٩] Roberfroid, M. (2002) Functional foods concept and its application to prebiotics. *Dig. Liver Dis.*, **34,** S105-S110.

[٨٠] Gibson, G.R. (2004) Fibers and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clin. Nutr. Suppl.*, **1,** 25-31.

[٨١] Janer, C., Rohr, L.M., Pelaez, C., Laloi, M., Cleusix, V., Requena, T., and Meile, L. (2004) Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant β-fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis. Syst. Appl. Microbiol.*, **27,** 279-285.

[٨٢] Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., and Verstraete, W. (2004) Prebiotic effect of chicory inulinin the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **51,** 143-153.

[٨٣] Lopez, H.W., Coudray, C., Levrat-Verny, M.A., Feillet-Coudray, C., Demigné, C., and Rémésy, C. (2000) Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J. Nutr. Biochem.*, **11,** 500-508.

[٨٤] Fishbein, L., Kaplan, M., and Cough, M. (1988) Fructooligosaccharides: a review. *Vet. Hum. Toxicol.*, **30,** 104-107.

[٨٥] Shiomi, N. (1978) Isolation and identifi cation of 1-kestose and neokestose from onion bulbs. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, **58,** 548-556.

[٨٦] Shiomi, N., Yamada, J., and Izawa, M. (1976) Isolation and identifi cation of fructo-oligosaccharides in roots and asparagus. *Agric. Biol. Chem.*, **40,** 567-575.

[٨٧] Hidaka, H., Hirayama, M., and Sumi, N. (1988) A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.*, **52,** 1181-1187.

[٨٨] Hidaka, H. and Hirayama, M. (1991) Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. *Biochem. Soc. Trans.*, **19,** 561-565.

[٨٩] Minami, Y., Yazawa, K., Tamura, Z., Tanaka, T., and Yamamoto, T. (1983) Selectivity of utilization of galactosyl oligosaccharides by bifidobacteria. *Chem. Pharm. Bull.*, **31,** 1688-1691.

[٩٠] Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Ueyama, S., Watanabe, T., Tanaka, R., Kan, T., Kuroda, A., and Sumihara, Y. (1993) *Oligosaccharides: Production, Properties and Applications,* vol. **3** (ed. T. Nakakuki), Gordon and Breach Science Publishers, Tokyo, pp. 90-106.

[٩١] Ziggers, D. (2001) TOS, a new prebiotic derived from whey. *Feed Mix*, **9,** 7-9.

[٩٢] Alles, M.S., Harteminck, R., Meyboom, S., Harryvan, J.L., Van Laere, K.M.J., Nagengast, F.M., and Hautvast, J.G.A.J. (1999) Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microfl ora and on putative risk markers for colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, **69,** 980-991.

[٩٣] Monsan, P. and Auriol, D. (2004) *Bioprocesses and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals* (eds J.R. Neeser and J.B. German), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 135-149.

[٩٤] von Roper, H., and Koch, H. (1983) New carbohydrate-derivatives from biotechnical and chemical processes. *Starch,* **40,** 453-459.

[٩٥] Yoneyama, M., Shibuya, T., and Miyake, T. (1996) Saccharides in powder form, preparation and uses. US Patent 5, 550, 226.

[٩٦] Amarakone, S.P., Ishigami, H., and Kainuma, K. (1984) Conversion of oligosaccharides formed during starch hydrolysis by a dual enzyme system. *Denpun Kagaku,* **31,** 1-7.

[٩٧] Kuriki, T., Yanase, M., Takata, H., Takesada, Y., Imanaka, T., and Okada, S. (1993) A new way of producing isomalto-oligosaccharides syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59,** 953-959.

[٩٨] Monsan, P., Potocki de Montalk, G., Sarçabal, P., Remaud-Siméon, M., and Willemot, R.M. (2000) *Food Biotechnology* (eds S. Bielecki, J. Tramper, and J. Polak), Elsevier, Amsterdam, pp. 115-122.

[٩٩] Hehre, E.J. (1955) *Methods Enzymol.,* **1,** 178.

[١٠٠] Koepsell, H.J., Tsuchiya, H.M., Hellman, N.N., Kasenko, A., Hoffman, C.A., Sharpe, E.S., and Jackson, R.W. (1952) Enzymatic synthesis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation. *J. Biol. Chem.,* **200,** 793-801.

[١٠١] Carlson, T.L., Woo, A., Zheng, G.-H. (2006) Methods of making syrups. WIPO WO/2006/088884.

[١٠٢] Argüello-Morales, M.A., Remaud-Siméon, M., Pizzut, S., Sarçabal, P., Willemot, R.M., and Monsan, P. (2000) Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase a sucrose glycosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiol. Lett.,* **182,** 81-85.

[١٠٣] Kossmann, J., Welsh, T., Quanz, M., and Karola, K. (2000) Nucleic acid molecules encoding alternansucrase, US Patent 6,570,065.

[١٠٤] Leathers, T.D., Nunnally, M., and Côté, G.L. (2002) Modified alternan, US Patent 7,049,105.

[١٠٥] Côté, G.L. and Holt, S.M. (2007) Prebiotic oligosaccharides via alternansucrase acceptor reactions, US Patent 7,182,954.

[١٠٦] Joucla, G., Pizzut, S., Monsan, P., and Remaud-Sim é on, M. (2006) Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its C-terminal domain. *FEBS Lett.,* **580,** 763-768.

[١٠٧] Paul, F., López-Munguía, A., Remaud, M., Pelenc, V., and Monsan, P. (1992) Method for the production of α-1,2 oligodextrans using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, US Patent 5,141,858.

[١٠٨] Remaud-Siméon, M., López-Munguía, A., Pelenc, V., Paul, F., and Monsan, P. (1994) Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides NRRL* B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α-1,2 linkages. *Appl. Biochem. Biotech.,* **44,** 101-117.

[١٠٩] Valette, P., Pelenc, V., Djouzi, Z., Andrieux, C., Paul, F., Monsan, P., and Szylit, O. (1993) Bioavailability of new synthesised glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J. Sci. Food Agric.,* **62,** 121-127.

[١١٠] Djouzy, Z., Andrieux, C., Pelenc, V., Somarriba, S., Popot, F., Paul, F., Monsan, P., and Szylit, O. (1995) Degradation and fermentation of α-gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: *in vitro* and *in vivo* studies in gnotobiotic rats. *J. Appl. Bacteriol.,* **79,** 117-127.

[١١١] Djouzi, Z. and Andrieux, C. (1997) Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microfl ora in rats inoculated with a human faecal flora. *Br. J. Nutr.,* **78,** 313-324.

[١١٢] Lamothe, J.P., Marchenay, Y., Monsan, P., Paul, F., and Pelenc, V. (1992) Compositions cosmétiques contenant des glucooligosaccharides, French Patent 2678166.

[١١٣] Boucher, J., Daviaud, D., Remaud-Sim é on, M., Carpéné, C., Saulnier-Blache, J.S., Monsan, P., and Valet, P. (2003) Effect of non-digestible gluco-oligosaccharides on glucose sensitivity in high fat diet fed mice. *J. Physiol. Biochem.,* **59,** 169-174.

[١١٤] Bozonnet, S., Dols-Laffargue, M., Fabre, E., Pizzut, S., Remaud-Siméon, M., Monsan, P., and Willemot, R.M. (2002) Molecular characterisation of DSR-E, an α-1,2 linkage synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. *J. Bacteriol.,* **184,** 5753-5761.

[١١٥] Fabre, E., Bozonnet, S., Arcache, A., Willemot, R.M., Vignon, M., Monsan, P., and Remaud-Siméon, M. (2005) Role of the two catalytic domains of DSR-E and their involvement in the formation of highly α-1,2 branched dextran. *J. Bacteriol.,* **187,** 296-303.

[١١٦] Cummings, J.H. and Englyst, H.N. (1991) Measurement of starch fermentation in the human large intestine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.,* **69,** 121-129.

[١١٧] Englyst, H.N., Kingman, S.M., and Cummings, J.H. (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **46,** S33-S50.
[١١٨] Sajilata, M.G., Singhal, R.S., and Kulkarni, P.R. (2006) Resistant starch-a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **5,** 1-17.
[١١٩] Asp, N.G. (1994) Nutritional classification of food carbohydrates. *Am. J. Clin. Nutr.*, **59,** S679-S681.
[١٢٠] Eerlingen, R.C. and Delcour, J.A. (1995) Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. *J. Cereal Sci.*, **21,** 1-8.
[١٢١] Eerlingen, R.C. and Delcour, J.A. (1995) Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. *J. Cereal Sci.*, **21,** 129-138.
[١٢٢] Englyst, H.N., Wiggins, H.S., and Cummings, J.H. (1982) Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*, **107,** 307-318.
[١٢٣] Haralampu, S.G. (2000) Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydr. Polym.*, **41,** 285-292.
[١٢٤] Tovar, J. and Melito, C. (1996) Staem-cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *J. Agric. Food Chem.*, **44,** 2642-2645.
[١٢٥] Siljestrom, M. and Asp, N.G. (1985) Resistant starch formation during baking. Effect of baking time and temperature and variation in the recipe. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **4,** 1-18.
[١٢٦] Marsono, Y. and Topping, D.L. (1999) Effects of particle size of rice on resistant starch and SCFA of the digesta in caecostomised pigs. *Indones. Food Nut. Prog.*, **6,** 44-50.
[١٢٧] Liljeberg, H., Akerberg, A., and Bjorck, I. (1996) Resistant starch formation in bread as influenced by choice of ingredients or baking conditions. *Food Chem.*, **56,** 389-394.
[١٢٨] Tester, R.F., Karkalas, J., and Qi, X. (2004) Starch structure and digestibility. Enzyme-substrate relationship. *World Poult. Sci.*, **60,** 186-195.
[١٢٩] Pomeranz, Y. and Sievert, D. (1990) Purified resistant starch products and their preparation, Patent No. WO/1990/015147.
[١٣٠] Soral, S.M. and Wronkowska, M. (2000) Resistant starch of pea origin. *Zywnosc*, **7,** 204-212.
[١٣١] Haralampu, S. and Gross, A. (1996) Granular resistant starch and method of making, US Patent 5,849,090.
[١٣٢] King, J.M. and Tan, S.Y. (2005) Resistant starch with cooking properties similar to untreated starch, US Patent Appl. No. 0,089,624.
[١٣٣] Buttcher, V., Welsh, T., Mitzer, L.S., and Kossmann, J. (1997) Cloning and characterization of the gene for amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* : production of linear α-1,4 glucan. *J. Bacteriol.*, **179,** 3324-3330.
[١٣٤] Potocki de Montalk, G., Remaud-Siméon, M., Willemot, R.M., Planchot, V., and Monsan, P. (1999) Sequence analysis of the gene encoding amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* and characterization of the recombinant enzyme. *J. Bacteriol.*, **181,** 375-381.
[١٣٥] Skov, L.K., Mirza, O., Henriksen, A., Potocki de Montalk, G., Remaud-Siméon, M., Willemot, R.M., Monsan, P., and Gajhede, M. (2001) Amylosucrase: a glucan-synthesizing enzyme from the α-amylase family. *J. Biol. Chem.*, **276,** 25273-25278.
[١٣٦] Albenne, C., Skov, L.K., Mirza, O., Gajhede, M., Feller, G., D'Amico, S., André, G., Potocki-Véronèse, G., van der Veen, B., Monsan, P., and Remaud-Siméon, M. (2003) Molecular basis of the amylase-like polymer formation catalysed by *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *J. Biol. Chem.*, **279,** 726-734.
[١٣٧] Rolland-Sabaté, A., Planchot, V., Potocki-Véronèse, G., Monsan, P., and Colonna, P. (2004) Elongation and insolubilisation of α-glucans by the action of *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *J. Cereal Sci.*, **40,** 17-30.
[١٣٨] Potocki-Véronèse, G., Puteaux, J.L., Dupeyre, D., Albenne, C., Remaus-Siméon, M., Monsan, P., and Buléon, A. (2005) Amylose synthesized *in vitro* by amylosucrase: morphology, structure and properties. *Biomacromolecules*, **6,** 1000-1011.
[١٣٩] http://www.suedzucker.de/en/Investor-Relations/Publikationen/Berichte/Berichte-2005-06/gb_e_2006.pdf. Accessed 25 January 2010.
[١٤٠] Higgins, J.A., Higbee, D.R., Donahoo, W.T., Brown, I.L., Bell, M.L., and Bessesen, D.H. (2004) Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. *Nutr. Metab.*, **1,** 8-18.

[١٤١] Fujii, S. and Komoto, M. (1991) Novel carbohydrate sweeteners in Japan. *Zuckerindustrie,* **116,** 197-200.

[١٤٢] Ajisaka, K., Nishida, H., and Fujimoto, H. (1987) The synthesis of oligosaccharides by reversed hydrolysis reaction of β-glucosidase at high substrate concentration and at high temperature. *Biotechnol. Lett.,* **9,** 243-248.

[١٤٣] Morgan, A.J., Mul, A.J., Beldman, G., and Voragen, A.G.J. (1992) Dietary oligosaccharides. New insights. *Agro. Food Ind. Hi-Tech.,* **11/12,** 35-38.

[١٤٤] Parajo, J.C., Garrote, G., Cruz, J.M., and Dominguez, H. (2004) Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends Food Sci. Technol.,* **15,** 115.

[١٤٥] Imaizumi, K., Nakatsu, Y., Sato, M., Sedarnawati, Y., and Sugano, M. (1991) Effects of xylooligosaccharides on blood glucose, serum and liver lipids and caecum short-chain fatty acids in diabetic rats. *Agric. Biol. Chem.,* **55,** 199-205.

[١٤٦] Kormelinck, F.J.M., Gruppen, H., Wood, T.M., and Beldman, G. (1992) *Xylans and Xylanases* (eds J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-Van Someren, and A.G.J. Voragen), Elsevier, London, pp. 141-147.

[١٤٧] Rycroft, C.E., Jones, M.R., Gibson, G.R., and Rastall, R.A. (2001) A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.,* **91,** 878-887.

[١٤٨] Santos, A., San Mauro, M., and Diaz, D.M. (2006) Prebiotics and their long-term influence on the microbial populations of the mouse bowel. *Food Microbiol.,* **23,** 498.

[١٤٩] Konietzny, U. and Greiner, R. (2002) Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.,* **37,** 791-812.

[١٥٠] Barrientos, L., Scott, J.J., and Murthy, P.P.N. (1994) Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiol.,* **106,** 1489-1495.

[١٥١] Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., and Zelder, O. (2005) Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **68,** 588.

[١٥٢] Mullaney, E.J., Daly, C.B., and Ullah, A.H. (2000) Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol.,* **47** (1), 157-199.

[١٥٣] Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., and Soccol, V.T. (2001) Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresour. Technol.,* **77,** 203-214.

[١٥٤] Vohra, A. and Satyanarayana, T. (2003) Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.,* **23,** 29-60.

[١٥٥] Greiner, R. and Konietzny, U. (2006) Phytase for food application. *Food Technol. Biotechnol.,* **44,** 125-140.

[١٥٦] Lassen, S.F., Breinholt, J., Ostergaard, P.R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M., and Fuglsang, C.C. (2001) Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii, Agrocybe pediades,* a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens. Appl. Environ. Microbiol.,* **67,** 4701-4707.

[١٥٧] Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., and van Loon, A.P. (1997) Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus. Appl. Environ. Microbiol.,* **63,** 1696-1700.

[١٥٨] Kim, Y.-O., Kim, H.-K., Bae, K.-S., Yu, J.-H., and Oh, T.-K. (1998) Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.,* **22,** 2.

[١٥٩] Nampoothiri, K.M., Tomes, G.J., Roopesh, K., Szakacs, G., Nagy, V., Soccol, C.R., and Pandey, A. (2004) Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.,* **118,** 205-214.

[١٦٠] Zhou, X.L., Shen, W., Zhuge, J., and Wang, Z.X. (2006) Biochemical properties of a thermostable phytase from *Neurospora cras* sa. *FEMS Microbiol. Lett.,* **258,** 61-66.

[١٦١] Casey, A. and Walsh, G. (2004) Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J. Biotechnol.,* **110,** 313-322.

[١٦٢] Lehmann, M., Loch, C., Middendorf, A., Studer, D., Lassen, S.F., Pasamontes, L., van Loon, A.P., and Wyss, M. (2002) The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein Eng.,* **15,** 403-411.

[١٦٣] Lehmann, M., Lopez-Ulibarri, R., Loch, C., Viarouge, C., Wyss, M., and van Loon, A.P. (2000) Exchanging the active site between phytases for altering the functional properties of the enzyme. *Protein Sci.,* **9,** 1866-1872.

[١٦٤] Zhang, W., Mullaney, E.J., and Lei, X.G. (2007) Adopting Selected Hydrogen Bonding and Ionic Interactions from *Aspergillus fumigates* Phytase Structure Improves Thermostability of *Aspergillus niger* PhyA Phytase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007, 73,** 3069-3076.

[١٦٥] Brinch-Pedersen, H., Sorensen, L.D., and Holm, P.B. (2002) Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends Plant Sci.*, **7,** 118.

[١٦٦] Golovan, S.P., Meidinger, R.G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M.Z., Barney, D.J., Plante, C., Pollard, J.W., Fan, M.Z., Hayes, M.A., Laursen, J., Hjorth, J.P., Hacker, R.R., Phillips, J.P., and Forsberg, C.W. (2001) Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat. Biotechnol.*, **19,** 741.

[١٦٧] Novoselova, T.A., Meuwissen, M.P.M., and Huirne, R.B.M. (2007) Adoption of GM technology in livestock production chains: an integrating framework. *Trends Food Sci. Technol.*, **18,** 175.

[١٦٨] Srivastava, M. and Kapoor, V.P. (2005) Seed galactomannans: an overview. *Chem. Biodivers.*, **2,** 295-17.

[١٦٩] Brufau, J., Francesch, M., and Pérez-Vendrell, A.M. (2006) The use of enzymes to improve cereal diets for animal feeding. *J. Sci. Food Agric.*, **86,** 1705-1713.

[١٧٠] Bedford, M.R. (2000) Exogenous enzymes in monogastric nutrition-their current value and future benefits. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **86,** 1-13.

[١٧١] Bedford, M.R. and Classen, H.L. (1992) Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is affected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion effi ciency of broiler chicks. *J. Nutr.*, **122,** 560-569.

[١٧٢] McKraken, K.J. and Quintin, G. (2000) Metabolisable energy content of diets and broiler performance as affected by wheat specific weight and enzyme supplementation. *Br. Poult. Sci.*, **41,** 332-334.

[١٧٣] Wu, Y.B., Ravindran, V., Thomas, D.G., Birtles, M.J., and Hendicks, W. (2004) Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. *Br. Poult. Sci.*, **45,** 76-84.

[١٧٤] Roberts, J.R. and Choct, M. (2006) Effects of commercial enzyme preparations on egg and eggshell quality in laying hens. *Br. Poult. Sci.*, **47,** 501-510.

[١٧٥] Bedford, M.R. (2000) Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. *World Poult. Sci. J.*, **56,** 347-365.

[١٧٦] Daskiran, M., Teeter, R.G., Fodge, D., and Hsiao, H.Y. (2004) Evaluation of endo-beta-D-mannanase (Hemicell) effects on broiler performance and energy use in diets varying in beta-mannan content. *Poult. Sci.*, **83,** 662-668.

[١٧٧] Lee, J.T., Bailey, C.A., and Cartwright, A.L. (2003) Beta-mannanase ameliorates viscosity-associated depression of growth in broiler chickens fed guar germ and hull fractions. *Poult. Sci.*, **82,** 1925-1931.

[١٧٨] Odetallah, N.H., Ferket, P.R., Grimes, J.L., and McNaughton, J.L. (2002) Effect of mannan-endo-1,4-beta-mannosidase on the growth performance of turkeys fed diets containing 44 and 48% crude protein soybean meal. *Poult. Sci.*, **81,** 1322-1331.

[١٧٩] Maisonnier-Grenier, S., Clavurier, K., Saulnier, L., Bonnin, E., and Geraert, P.-A. (2006) Biochemical characteristics of wheat and their relation with apparent metabolisable energy value in broilers with or without non-starch polysaccharide enzyme. *J. Sci. Food Agric.*, **86,** 1714-1721.

[١٨٠] Choct, M. (2006) Enzymes for the feed industry: past, present and future. *Worlds Poult. Sci. J.*, **62,** 5-15.

[١٨١] Choct, M., Kocher, A., Waters, D.L.E., Pettersson, D., and Ross, G. (2004) A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. *Br. J. Nutr.*, **92,** 53-61.

[١٨٢] Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., and Drauz, K. (2005) Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69,** 1-8.

[١٨٣] Bercovici, D. and Fuller, M.F. (1995) Industrial amino acids in nonruminant animal nutrition, in *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding* (eds R.J. Wallace and A. Chesson), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 93-113.

[١٨٤] Ikeda, M. (2003) Amino acid production processes, in *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, vol. **79** (eds T. Scheper, R. Faurie, and J. Thommel), Springer, Berlin, pp. 1-35.

[١٨٥] Kimura, E. (2003) Metabolic engineering of glutamate production, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. **79** (eds T. Scheper, R. Faurie, and J. Thommel), Springer, Berlin, pp. 37-57.

[١٨٦] Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Moeckel, B., Pfefferle, W., Puehler, A., Rey, D.A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegrabe, I., and Tauch, A. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence. *J. Biotechnol.*, **104,** 5-25.

[١٨٧] Calton, G.J. (1992) The enzymatic production of L-aspartic acid, in *Biocatalytic Production of Amino Acid and Derivatives* (eds J.D. Rozzell and F. Wagner), Hanser, M ü nchen, pp. 59-74.

[١٨٨] Oyama, K. (1992) *Chirality in Industry*, Chapter 11 (eds A.N. Collins, G.N. Sheldrake, and J. Crosby), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

[١٨٩] Pfefferle, W., Moeckel, B., Bathe, B., and Sahm (2003) *Marx in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. **79** (eds T. Scheper, R. Faurie, and J. Thommel), Springer, Berlin, pp.59-112.

[١٩٠] de Graaf, A.A., Eggeling, L., and Sahm H. (2001) *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, vol. **73** (eds. T. Scheper, R. Faurie, and J. Thommel), Springer, Berlin, pp. 9-29.

[١٩١] Debabov, V.G. (2003) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. **79** (eds T. Scheper, R. Faurie, and J. Thommel), Springer, Berlin, pp. 59-112.

[١٩٢] Ikeda, M., and Katsumata, R. Hyperproduction of tryptophan by Corynebacterium glutamicum with the modified pentose phosphate pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65,** 2497-2502.

[١٩٣] Drauz, K., and Waldmann, H. (2002) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, 2nd edn, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[١٩٤] Chibata, I. (1978) *Immobilized Enzymes*, Kodansha-Halsted Press, Tokyo.

[١٩٥] Woeltinger, J., Karau, A., Leuchtenberger, W., and Drauz, K. (2005) Membrane reactors at Degussa, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. **92** (ed. T. Scheper), Springer, Berlin, pp. 289-316.

obeikandl.com

obeikandl.com

الفصل الحادي عشر

التقنية الحيوية الصناعية في قطاع الورق واللب

INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY IN THE PAPER AND PULP SECTOR

ليزا فيكاري، ستينا جرونكفيست، كريستينا كروس، جاكو بيري، ماتي سييكا-أهو، و آنا سورناكي

Liisa Viikari, Stina Grönqvist, Kristiina Kruus, Jaakko Pere, Matti Siika-aho, and Anna Suurnäkki

(١١,١) المقدمة Introduction

تسعي صناعة الغابات الحديثة إلى الجمع بين الاستدامة مع الإنتاجية والربحية. وأحد الأهداف في الوقت الحاضر هو زيادة قيمة منتجات الألياف من خلال البحث والتطوير، من أجل خلق منتجاتٍ جديدة وزيادة تطبيقات ومجالات استخدام المواد الخام. وترتبط التحديات العامة التي تواجه هذه الصناعة بتراجع صناعة الغابات التقليدية وشركات صناعة الورق، داعيةً إلى فرصٍ جديدة للنمو وأعلى استعادة للاستثمارات. منذ ثمانينيات القرن الماضي، تم توجيه الضغط الناتج من الآثار البيئية بسبب الحاجة إلى تحسين أداء العملية وتقليل التدفقات إلى البيئة إلى تحسين نوعية وتوافر المواد الخام، وتكلفة الطاقة، وسلاسل الإنتاج إضافية القيمة. وتشمل السلاسل الحالية سلاسل الألياف والطاقة الحيوية، على أن تستكمل في المستقبل بأخرى جديدة، مثل سلاسل المواد الكيميائية والوقود الحيوي.

وكانت البحوث في مجال التقنية الحيوية في صناعة اللب والورق نشطة لعقود عديدة. وشملت خلال السنوات العشرين الماضية الاكتشافات الأساسية في المجال التقارير الأولية على الإنزيمات المحللة للجنين، واستخدام الزيلانيزات في التبييض، والليبيزات لإزالة البقع، والإزالة الإنزيمية للأحبار، وتعديل أسطح الألياف، ومزج اللاكيز مع المواد الوسيطة لإزالة اللجنين. ويعد تطوير المعالجة الميكروبية لرقائق الخشب لأغراض الاستخلاص الحيوي أو لمعالجة مشكلات البقع حالياً خيارات مثيرة للاهتمام لتحسين جودة المواد الخام. في السنوات الأخيرة، استخدم المجال أيضاً التقنية الحيوية لتعديل تركيب الخشب والمواد النباتية الأخرى، على سبيل المثال عن طريق تغيير تركيب اللجنين. وقد فتحت الهندسة الوراثية مجموعة واسعة من الاحتمالات لتحسين نمو

وخصائص المواد الخام في الغابات، مباشرةً عن طريق إدخال جينات جديدة أو عن طريق تعزيز فهم وظائف النبات من خلال البحوث الجينومية جنباً إلى جنبٍ مع الزراعة التقليدية. فيمكن أن تقدم الأشجار سريعة النمو، على سبيل المثال، منخفضة محتوى اللجنين أو ذات خصائص لجنين هيكلية متغيرة، فوائد عملية مهمة. وإزالة اللجنين من جدران الخلايا الخشبية هي الخطوة الأكثر كثافة رأسمالية وإشكالية بيئية في معالجة الخشب للورق واللب. وعليه، يمكن أن يقدم الحد من محتوي اللجنين فوائد اقتصادية وبيئية.

وسوف تساعد أي زيادة في الكفاءة تسمح بإنتاج المزيد من الخشب والمنتجات الخشبية من مساحة أقل من الأرض على المحافظة على الغابات الطبيعية وتقليل الأثر البيئي لمعالجة الخشب إلى منتجات اللب والورق. ولا يزال هناك شوطاً طويلاً، مع ذلك؛ لاستغلال هذه التحسينات العملية. سوف يعتمد الاستغلال المستقبلي لأشجار الغابات المعدلة وراثياً على الإجابات التي تعطي للأسئلة العلمية والأخلاقية، وكذلك على الحوار والتوافق الذي يتم التوصل إليهما بين الصناعة والجمهور. ومع ذلك، سوف يساعد الفهم الأساسي لآليات تخليق مكونات الخشب والألياف على تحسين نوعية الألياف حتى بواسطة تقنيات الزراعة التقليدية المستخدمة بالفعل في الغابات.

كانت هناك توقعات كبيرة لظهور تقنيات جديدة متطورة اعتماداً على التقنية الحيوية في صناعة اللب والورق. وقد أثبت تنفيذ مراحل أو معالجات التقنية الحيوية الاقتصادية والقابلة للتطبيق من الناحية الفنية على مستوى عملية الطحن أنه يكون صعباً. فتطبيقات التقنية الحيوية المنافسة للعمليات الميكانيكية و/ أو الكيميائية يجب أن تتجاوز أدائها وينتج عنها فوائد اقتصادية دون تغيير جودة المنتج حتى يتسنى لها القبول. ويبدو أن معظم تطبيقات التقنية الحيوية المستقبلية من المرجح أن توجد في مجالات المنتجات المتخصصة، والتغييرات المستهدفة للألياف والتحكم في سلامة المنتجات.

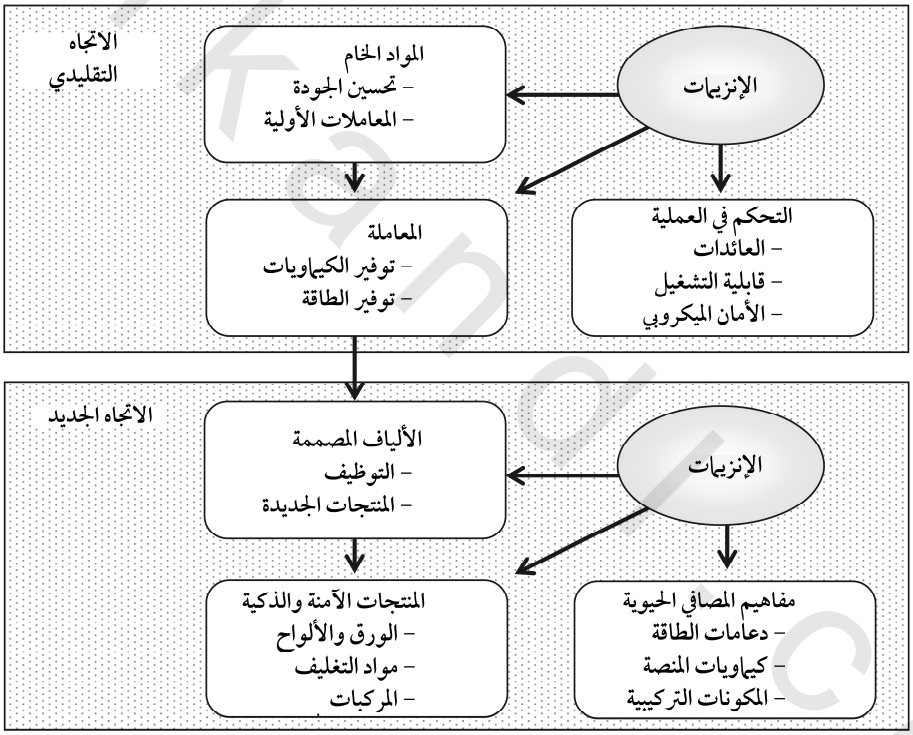
إن إدخال الإنزيمات الناجح إلى عمليات اللب والورق يتطلب على الأقل تحقيق المعايير التالية:

- يجب الحصول على فوائد اقتصادية واضحة من المرحلة الإنزيمية.
- يجب الحفاظ على أو تحسين ثبات جودة ومعالجة مواد الألياف.
- يجب أن لا تحدث تغييرات غير مرغوب فيها في قدرة العملية على التشغيل.
- يجب توفر الإنزيم المناسب في كميات كبيرة وبسعرٍ معقول للمحاولات على مستوى الطاحونة وبعد ذلك للاستخدام الصناعي سريعاً.

إن استخدام الإنزيمات المختلفة في تعديل أو هندسة الألياف، بالإضافة إلى استخدامها كمساعدات للعملية، هو مجال مثير للاهتمام وممكن التطبيق لكلٍ من اللب الكيميائي والميكانيكي (الشكل رقم ١ , ١١). يمكن إيجاد خصائص ألياف محسنة أو خصائص جديدة تماماً للألياف عن طريق التعديل المستهدف لسطح الألياف

بالمعالجة الإنزيمية أو الإنزيمية الكيميائية المزدوجة. ويمكن استخدام هندسة الألياف لتحسين خصائص تصنيع الورق والألواح لألياف اللب ولتعديل الألياف المناسبة للتطبيقات غير الورقية.

ولن تكون مصادر الطاقة غير المتجددة التي يعتمد عليها حالياً بصورةٍ كبيرة متاحة في المستقبل بالكميات المستخدمة حالياً. وعليه، فمن الضروري النظر في التوسع في استخدام الكتلة الحيوية النباتية، وخاصةً المواد الخام للغابات المتوفرة بكثرة. ومفهوم المصفاة الحيوية هو مماثل لمفهوم مصفاة البترول حيث يتم تجزأة مادة أولية وحيدة وتحويلها إلى الكثير من المنتجات السلعية. ومواد الغابات الخام لها امكانية كبيرة للحد من انبعاثات غازات الاحتباس الحراري عن طريق تحويل مواد الغابات في المصافي الحيوية إلى وقود سائل، ومواد كيميائية، وغيرها من المنتجات. وسوف تؤدي التقنية الحيوية الصناعية أيضاً دوراً حيوياً في هذه التطبيقات المستقبلية (الشكل رقم ١ , ١١).



الشكل رقم (١ , ١١). بؤر الاهتمام التقليدية والجديدة للتطبيقات الإنزيمية في صناعة اللب والورق.

(٢ , ١١) الإنزيمات لصناعة اللب والورق Enzymes for the Pulp and Paper Industry

بسبب الكيمياء المعقدة الموجودة في المواد الخشبية، فإنه يمكن استخدام عدد من مختلف الإنزيمات لتحسين عمليات اللب والورق. تمت دراسة السليوليزات بشكلٍ مكثف لأكثر من عقدين وتم كشف آليات تفاعل الكثير من بروتينات الإنزيمات على المستوى الجزيئي. وعلم إنزيمات الهيميسليوليزات هو أيضاً راسخ. ومؤخراً، تم فهم

الآليات التفصيلية لإنزيمات الأكسدة بصورةٍ كبيرة. وفتح مفهوم استخدام إنزيم أكسدة مع جزئيات وسيطة ناقلة للإلكترون آفاقاً جديدة لتقنيات الأكسدة المعتمدة على الإنزيم وإزالة اللجنين. وقد انخفضت أسعار الهيدروليزات التجارية عدة أضعاف خلال العقدين الأخيرين. وهناك توقع لمزيد من التحسينات الوظيفية، وخاصةً للإنزيمات النشطة في الظروف القاسية. وقد تم بالفعل تطوير إنزيمات جديدة تتحمل ظروف الحرارة والقلوية العالية لظروف العملية القاسية (أي ارتفاع أو انخفاض درجة الرقم الهيدروجيني و/ أو ارتفاع درجة الحرارة) السائدة عادةً في عمليات تصنيع اللب والورق.

(١, ٢, ١١) السليوليزات Cellulases

السليولوز هو الكربوهيدرات الرئيس في المواد اللجنوسليولوزية. وهو بوليمر متجانس بسيط كيميائياً، يتكون من وحدات بيتا-١،٤-أنهيدروجلوكوبيرانوزيد مرتبطة. وفي ألياف النبات، ومن ثم في لب السليلوز، تتحاذي سلاسل السليلوز الفردية بصورة متوازية، مشكلةً السليولوز ١، وسلاسل السليولوز من الألياف الأولية المرتبطة بإحكام والتي تتجمع لتشكل تراكيب لييفية أكبر [١، ٢]. يحتوي السليولوز على مناطق منتظمة بلورية وأخرى غير متبلورة أقل انتظاماً. وفي ألياف الخشب يختلف اتجاه تعرج لييفات السليولوز الدقيقة في مختلف طبقات جدار الخلية معطياً الألياف قوتها ومرونتها الفريدة.

السليولوز البلوري هو السكر العديد الأكثر مقاومةً في المواد اللجنوسليولوزية ويتطلب جهوداً متضافرة من عـدة إنزيمات، والتي يمكـن تصنيفها إلى إندو-بيتا-١،٤-جلوكانيزات (EC 3.2.1.4)، وسيلوبيوهيدريزات (EC 3.2.1.91)، وبيتا-جلوكوسيديزات (EC 3.2.1.21). والسيلوبيوهيدريزات التي تحرر وحدات السيلوبيوز بالتتابع من نهايات سلاسل السليولوز هي الإنزيمات الرئيسة في التحلل الكلي للسليولوز البلوري. وهي تشكل حوالي ٨٠٪ من مجموع البروتينات المحللة للسليولوز المفرزة من الفطر الخيطي ترايكوديرما ريسيي، والذي لديه واحد من أكثر النظم المحللة للسليولوز دراسة على نطاقٍ واسع والمطبق صناعياً [٣]. تعمل الإندوجلوكانيزات بشكلٍ رئيس على المناطق غير المتبلورة من ألياف السليولوز بينما تحلل البيتا-جلوكوسيديزات السيلوبيوز بعد ذلك إلى الجلوكوز.

السيلوبيوهيدريزات والإندوجلوكانيزات الفطرية المنشأ عادةً ما يكون لها تركيب متعدد المجالات يتكون من وحدة تحفيز كبيرة متصلة بواسطة ببتيد رابط إلى مجال ربط سليولوز صغير (CBD) أو مجال ربط الكربوهيدرات (CBM) [٤، ٥]. وهناك حاجة للـ CBD للنشاط الكامل لهذه الإنزيمات على وسائط التفاعل البلورية. وقد تبين أن قدرة السيلوبيوهيدريزات على تحليل السليولوز البلوري تقل بشكلٍ واضح عند غياب الـ CBD [٦]. وقد تم

استكشاف هذه الخاصية في تعديل الألياف من أجل الحد من تحلل لييفات السليولوز غير المرغوب فيه. وفي الوقت الحاضر، يتم تجميع الهيدروليزات وفقاً لتشابه تسلسلها والتفاف بروتين مجالاتها المحفزة إلى أكثر من ٧٠ عائلة (http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html).

تقليدياً، كانت السليوليزات التجارية تتألف من مخلوطات إنزيمية متعددة المكونات تنتج أساساً من السلالات الفطرية. وسببت هذه سابقاً مشكلات في الاستخدام الصناعي؛ بسبب عدم تخصصيتها وقوة تحليلها العالية، والتي تضر بخصائص قوة اللب. ووفرت التقنية الحيوية الحديثة أدوات فعالة لاكتشاف البروتينات الجديدة وإنتاجها بكفاءة على مستوى صناعي. وقد أدى ذلك إلى إتاحة تحضيرات سليوليز أحادية المكون تجارياً والمصممة لتطبيقات خاصة للعملية. ويمكن أيضاً أن تجد الإنزيمات أحادية المكون التي يتم تسويقها لتطبيقاتٍ أخرى (على سبيل المثال، الإندوجلوكانيزات لمعالجة المنسوجات) استخدامات في معالجة اللب والورق. عادةً تكون السليوليزات التجارية من أصلٍ فطري (من الترايكوديرما، والهوميكولا، والأكريمونيوم) وعادة ما يتم إنتاجها في السلالات الفطرية المعدلة وراثياً (على سبيل المثال، الترايكوديرما أو الأسبرجيلس).

(٢, ٢, ١١) الهيميسليوليزات Hemicellulases

الزيلان والجلوكومانان هما أكثر اثنين من هيميسليولوزات الخشب شيوعاً. تحتوي الأخشاب الصلبة أساساً على الزيلان، الذي يتكون من وحدات بيتا-دي-زيلوبيرانوزيل مع حمض ٤-*O*-ميثيل-ألفا-دي-جلوكورونيك ومجموعات أسيتيل جانبية. يرتبط حمض ٤-*O*-ميثيل-جلوكورونيك بعمود الزيلان الفقري بواسطة رابطة جليكوسيدية *O*-(٢،١) وتتم أسترة حمض الخليك في ذرة الكربون ٢ و/أو مجموعة الهيدروكسيل على ذرة الكربون ٣. وفي الأخشاب اللينة، يكون الجلوكومانان هو الهيميسليولوز الرئيس. وحوالي ثلث هيميسيلولوز الخشب اللين هو أرابينو-٤-*O*-ميثيل جلوكورونوزيلان، والذي يتم فيه استبدال عمود الزيلان الفقري في ذرة الكربو ٢، ٣ بحمض ٤-*O*-ميثيل-ألفا-دي-جلوكورونيك وأطراف ألفا-إل-أرابينوفيورانوزيل، على التوالي. وجالاكتوجلوكومانان الخشب اللين له عمود فقري من وحدات بيتا-دي-جليكوبيرانوزيل مرتبطة في الوضع بيتا-(٤،١) ووحدات بيتا-دي-مانوبيرانوزيل والتي يتم استبدالها جزئياً بألفا-دي-جالاكتوبيرانوزيل ومجموعات اسيتيل. ويختلف توزيع الكربوهيدرات في ألياف الخشب؛ تبعاً لأنواع الأشجار وظروف النمو [٧].

يحدث تغيير جذري في حجم وتكوين مكونات الهيميسليولوز في طريقة طهي كرافت. ويتم تحليل جميع مجموعات الأسيتيل وتحويل معظم مجموعات حمض الجلوكورونيك في الزيلان إلى مجموعات حمض هيكسينورونيك [٨]. ويتم نزع الأسيتيل من جلوكومانان الخشب وإذابة جزء كبير في سائل الطبخ عالي

القلوية والساخن جداً [٧]. وهكذا، تزيد كمية الزيلان النسبية في لب الخشب اللين بطريقة كرافت خلال عملية الاستخلاص.

تحفز الإندوزيلانيزات (EC 3.2.1.8) التحليل العشوائي لروابط البيتا-دي-١،٤ الزيلوزيدية في الزيلانات. وتنتمي معظم الزيلانيزات إلى مجموعتي هيدروليزات الجليكوزيل المختلفين تركيبياً (العائلة ١٠ و١١). وقد ذكر أن بعض الزيلانيزات تحتوي إما مجال رابط للزيلان [٩] وإما مجال رابط للسليولوز [١٠، ١١]. وقد وجد أن بعض مجالات الربط تزيد من درجة التحليل للزيلان المرتبط بالألياف بينما بعضهم الآخر لا يفعل. ولم يثبت أن للمجال الرابط للزيلان أو للسليولوز أي دور مهم في عمل الزيلانيزات على ألياف اللب [١٢]. ومعظم الزيلانيزات التي تم توصيفها قادرة على تحليل أنواع مختلفة من الزيلانات وتظهر الاختلافات فقط في طيف المنتجات النهائية. وتم توصيف عدد من الإنزيمات التي تنتجها الكائنات الحية القادرة على العيش في الظروف القاسية، ولكن من المدهش أن القليل قد وصل إلى الاستخدام التجاري، من الواضح؛ بسبب مشكلات تتعلق بإنتاجها الفعال في السلالات المضيفة المغايرة.

تحفز الإندومانانيزات (EC 3.2.1.78) التحليل العشوائي لروابط البيتا-دي-مانانوبيرانوزيل داخل السلسلة الرئيسة للمانانات والسكريات المختلفة التي تتكون أساساً من المانوز، مثل الجلوكومانانات، والجالاكتومانانات والجالاكتوجلوكومانانات. وتبدو المانانات أيضاً مجموعة إنزيمات غير متجانسة أكثر من الزيلانيزات. ووجد أن المانانيز من الترايكوديرما ريسيي له تركيب متعدد المجالات مماثل لذلك الموجود في الكثير من الإنزيمات المحللة للسليولوز؛ أي أن البروتين يحتوي على مجال تحفيز أساسي يتم فصله عن طريق رابط عن المجال الرابط للسليولوز [١٣، ١٤]. ووجد أن الـ CBD يزيد عمل المانانيز من الترايكوديرما ريسيي على الجلوكومانان المرتبط بالألياف على الرغم من أن المجال المحفز قادر على تحليل المانان البلوري بكفاءة [١٥]. ويعتمد عائد الجلوكومانان من التحليل على درجة الاستبدال وكذلك على توزيع المستبدلات [١٦]. ويتأثر تحليل الجلوكومانان أيضاً بنسبة الجلوكوز-إلى-المانوز.

ويمكن شق المجموعات الجانبية المرتبطة بسلاسل الزيلان والجلوكومانان الرئيسة بواسطة ألفا-جلوكورونيديز (EC 3.2.1.131)، وألفا-أرابينوزيديز (EC 3.2.1.55)، وألفا-جالاكتوزيديز (EC 3.2.1.22). وتتم إزالة مستبدلات الأسيتيل المرتبطة بالهيميسليولوز بواسطة الإستيريزات (EC 3.1.1.72) [١٧]. وتكون معظم الإنزيمات التي تشق المجموعات الجانبية قادرة على العمل فقط على وسائط التفاعل الأوليجومرية التي تنتجها الإنزيمات التي تفكك بلمرة العمود الفقري، أي، الزيلانيزات والمانانيزات. وعدد قليل فقط من الإنزيمات قادر على مهاجمة الوسائط البوليمرية السليمة. ومع ذلك، فإن أكثر الإنزيمات المساعدة من هذا النوع الأخير تفضل وسائط التفاعل الأوليجومرية.

تشمل الروابط التساهمية التي تربط اللجنين والهيميسيليولوز في جدران الخلايا النباتية الروابط الإسترية بين كحولات اللجنين ومجموعات الكربوكسيل لأحماض اليورونيك في الجلوكورونوزيلانات. مؤخراً، تم إثبات وجود إنزيم الكربوهيدرات إستيريز الذي يمكن أن يحلل هذه الروابط [١٨]. وتخصصية وسط التفاعل لهذا الجلوكورونيل إستيريز، الذي يهاجم حصرياً استرات حمض ٤-O-ميثيل-دي-الجلوكورونيك، متميزة عن تلك التي لإستيريزات الكربوهيدرات الأخرى، مثل إستيريز الأسيتيل زيلان، وإستيريز الفيريوليل، وإستيريز البكتين ميثيل.

(١١,٢,٣) الترانسفيريزات Transferases

تشمل الإندوجلوكانيزات المتخصصة للزيلوجلوكان فئة جديدة من الإنزيمات المحللة للسكريات العديدة، التي يمكن أن تهاجم عمود الجلوكان الفقري أيضاً في مواضع استبدال أطراف الجلوكوز [١٩]. إندو-ترانس جليكو زيليز الزيلوجلوكان (XET, EC 2.4.1.207) قادر على نقل جزء عالي الوزن الجزيئي من زيلوجلوكان مانح إلى متقبل مناسب مثل سكر أحادي مشتق من الزيلوجلوكان. وقد وجد أن الزيلوجلوكانيز من الأسبرجيلس نيجر يكون فعالاً ضد الكثير من البيتا-جلوكانات، ولكن لديه نشاط أعلى ضد زيلوجلوكان التمر الهندي [٢٠]. وقد تم توصيف إنزيم متخصص للنبات يعتقد أنه مسؤول عن تعديل الزيلوجلوكان في جدار الخلية من خلال نشاط التحليل الداخلي والجليكوزيل ترانسفيريز [٢١، ٢٢]. وبسبب القدرة الكامنة في XET لتحفيز انتقال الجليكوزيل بدلاً من التحليل، فإن هذا الإنزيم لديه إمكانات لتعديل الألياف [٢٣].

(١١,٢,٤) الإنزيمات المؤكسدة المعدلة للجنين Lignin-Modifying, Oxidative Enzymes

اللجنين هو، بوليمر عطري، غير متبلور، وغير متجانس يشكل جزءاً لا يتجزأ من جدار الخلية، يتغلل في مصفوفة بوليمر الكربوهيدرات من السليولوز والهيميسيليولوز. يضم اللجنين ثلاث وحدات فينيل بروبانويد: جوايأسيل، وسيرينجيل، ووحدات هيدروكسي فينيل. ويختلف تكوين اللجنين الدقيق على نطاقٍ واسع مع نوع الشجرة، ولكن كقاعدةٍ عامة، يحتوي الخشب اللين أساساً على وحدات جوايأسيل بينما الأخشاب الصلبة تحتوي أيضاً على وحدات بناء من السيرينجيل. وقد قيل أن كلاً من تركيب اللجنين الكيميائي ثلاثي الأبعاد يتأثر بقوة بمصفوفة السكريات العديدة. على عكس السليولوز والهيميسيليولوز، فإن اللجنين ليس عرضة لهجوم الإنزيمات المحللة. وقد تمت دراسة الإنزيمات المعدلة له بطريقةٍ مكثفة لأكثر من ٣٠ عاماً، وأدت البحوث إلى تعريف نظم الإنزيم الرئيسة المعتقد مشاركتها في إزالة اللجنين.

تشمل البروكسيديزات والأوكسيديزات التي تفرز خارج الخلية التي يعتقد أنها تشارك في تحليل اللجنين بيروكسيديزات اللجنين (LiP, EC 1.11.1.14)، وبيروكسيديزات المنجنيز (MnP, EC 1.11.1.13)، وبيروكسيديزات متنوعة (VP, EC 1.11.1.16)، واللاكيزات (EC 1.10.3.2)، وكذلك الإنزيمات المنتجة لفوق أكسيد الهيدروجين، مثل أوكسيديز الكحول الأريلي (AAO, EC 1.1.3.7) وأوكسيديز الجليوكزال (EC 1.1.3.-) التي تنتجها فطريات العفن الأبيض وفطريات تحليل القمامة المحللة للجنين في تركيبات مختلفة [٢٤]. على الرغم من الهندسة البنائية المختلفة تماماً للبروتين، فإن إنزيمات البيروكسيديزات واللاكيزات تشترك في خصائص مهمة فيما يتعلق بالوسائط المختزلة. ومع ذلك؛ نظراً للاختلافات بين التراكيب ثلاثية الأبعاد، والمجموعات الاصطناعية، ومتقبلات الإلكترون، فإن البيروكسيديزات واللاكيزات تعمل بآليات تحفيز مختلفة جداً.

وقد زاد تحليل علاقة التركيب بالوظيفة إلى حدٍ كبير من معرفتنا للإنزيمات المعدلة للجنين وطريقة عملها على المركبات العطرية. ومع ذلك، لا تزال المعلومات عن كيفية عمل هذه الإنزيمات على اللجنين البوليمري غير كاملة.

بسبب الطبيعة غير التخصصية للتحفيز بواسطة الإنزيمات المعدلة للجنين فإنه ينظر إلى تطبيقاتها في التقنية الحيوية على أنها واعدة للغاية. في المختبر، تؤدي تفاعلات الأكسدة لهذه الإنزيمات بشكلٍ رئيس إلى بلمرة اللجنين. وقد أظهرت الإنزيمات المحللة للجنوسليولوز، أنها تسبب تحليل محدود للجنين بشرط التدعيم بالمواد المضافة، مثل الكحول وفوق أكسيد الهيدروجين للـ LiP [٢٥]، المنجنيز، وفوق أكسيد الهيدروجين، والأحماض العضوية والمواد المقللة للتوتر السطحي للـ MnP [٢٦، ٢٧] والمواد الوسيطة للاكيزات. وبسبب النتائج الواعدة، فقد أصبحت اللاكيزات والبيروكسيديزات المعتمدة على المنجنيز مؤخراً أكثر المجموعات الإنزيمية دراسة على نطاقٍ واسع في مجال تحليل اللجنين.

(١, ٤, ٢, ١١) البيروكسيديزات Peroxidases

البيروكسيديزات المحللة للجنين، LiP, MnP, VP، هي بروتينات هيم مرتبطة تركيبياً تؤكسد أوساط تفاعلها بفوق أكسيد الهيدروجين كمتقبل للإلكترونات من خلال آلية أكسدة أحادية الإلكترون، مثل جميع البيروكسيديزات الأخرى. LiPs قادرة على أكسدة أوساط تفاعل مختلفة بما في ذلك الكحول الفيراتريلي، وتراكيب اللجنين الفينولية وغير الفينولية. وتنتج التفاعلات المحفزة بالـ LiP شقوق كاتيونية للأريل والفينوكسيل. ويؤدي تشكيل الشقوق الكاتيونية في تراكيب اللجنين غير الفينولية إلى تفاعلات غير متخصصة، مما يؤدي في نهاية المطاف إلى انقسام الحلقة [٢٨]. وقد تم توصيف الـ LiPs من الكثير من فطريات العفن الأبيض. والتراكيب ثلاثية الأبعاد

للـ LiPs من فانيروشيتي كريزوسبوريوم متاحة [٢٩، ٣٠]. وقد جرت محاولات لإنتاج الـ LiP بإفراط في العوائل غير المتجانسة وكانت في معظمها غير ناجحة وأعاق هذا الاستغلال التجاري للإنزيم.

تؤكسد البيروكسيديزات التي تعتمد على المنجنيز (MnP) المنجنيز$^{+2}$ إلى المنجنيز$^{+3}$. وعملية حجب المنجنيز$^{+3}$ بواسطة الأحماض العضوية هي ضرورية من أجل تحقيق استقرار الأيون وتحفيز تحرره من الإنزيم. ويمكن لحاجب المنجنيز$^{+3}$ أن يؤكسد أوساط فينولية مختلفة، والأحماض الكربوكسيلية، والدهون غير المشبعة. عندما يؤكسد المنجنيز$^{+3}$ تراكيب اللجنين الفينولية، تتكون شقوق وتحدث مجموعة متنوعة من التفاعلات غير المتخصصة، مما يؤدى إلى منتجات مشابهة لتلك الصادرة عن الـ LiPs (كما استعرض فـي المرجع [٣١]). ومن المثير للاهتمام، أن الـ MnP تبين أنها تعزز الأكسدة الفوقية للدهون غير المشبعة بدون إضافة فوق أكسيد الهيدروجين. وفي تفاعلات الأكسدة الفوقية المعتمدة على الدهون يستطيع الـ MnP أكسدة حتى تراكيب اللجنين غير الفينولية [٣٢]. وقد تم تعيين الـ MnP في معظم الفطريات المحللة للجنين التي درست حتى الآن [٣٣، ٣٤]، مما يوحي بدورٍ حاسمٍ في تحليل اللجنين.

وقد تم مؤخراً وصف بيروكسيديزات متنوعة كعائلة جديدة من البيروكسيديزات المحللة للجنين [٣٥]. وحتى الآن، يبدو أن الـ VP تنتجها فقط عدة فطريات، بما في ذلك البلوروتاس، والبجيركانديرا، والليبيستا. والجانب الأكثر لفتاً للنظر للـ VP هو أنها تجمع خصائص التخصصية لوسط التفاعل لعائلات البروكسيديزات الفطرية الأخرى. وهي من ثم قادرة على أكسدة مجموعة متنوعة من أوساط التفاعل (عالية ومنخفضة الجهد الاختزالي) بما في ذلك المنجنيز$^{+2}$، وثنائيات اللجنين الفينولية وغير الفينولية، وحمض ألفا-كيتو-جاما-ثيوميثيل بيوتيريك (KTBA)، والكحول الفيراتريلي، والبنزيات ثنائية الميثوكسي، والأنواع المختلفة من الأصباغ، والفينولات المستبدلة، والهيدروكينونات. وقد اقترح أن خصائص التحفيز للبيروكسيديزات الجديدة هي نتيجة لهجين الهندسة البنائية الجزيئية التي تشمل مواقع مختلفة لارتباط وسط التفاعل وللأكسدة [٣٦، ٣٧].

(٢, ٤, ٢, ١١) اللاكيزات Laccases

اللاكيزات هي إنزيمات شائعة في الطبيعة. ويفترض أنها إنزيمات الأوكسيدوريداكتيزات الأكثر شيوعاً في فطريات العفن الأبيض وتوجد أيضاً على نطاقٍ واسع في الفطريات الأخرى، وبعض البكتيريا، وكذلك في النباتات والحشرات. وقد ذكر أن اللاكيزات النباتية لها دور مهم في استجابة الجرح وتخليق اللجنين، في حين تشارك اللاكيزات في الفطريات في تحليل اللجنين ولها عدة وظائف أخرى بما في ذلك التصبغ، وتكوين أجسام الاثمار، والتجرثم، وكذلك الإمراض [٣٨-٤٠].

اللاكيزات هي إنزيمات معدن النحاس تحتوي على أربع ذرات نحاس في موقع نشاطها. ومن المستغرب أن لديها تخصصية واسعة لوسط التفاعل وتحفز أكسدة المركبات الفينولية المختلفة، والأمينات العطرية، وحتى بعض الجزيئات غير العضوية. تؤكسد اللاكيزات أوساط تفاعلها بآلية إزالة إلكترون واحد وتستخدم الأكسجين الجزيئي كمتقبل إلكترون نهائي. وتقتصر قدرة اللاكيزات على أكسدة اللجنين على الوحيدات الفينولية. وتتكون الشقوق الفينولية في اللجنين وتخضع لمزيدٍ من التفاعلات الأخرى غير المتخصصة، والتي يمكن أن تؤدي إلى شق رابطة ذرة الكربون ألفا مع الأريل، ونزع مجموعة الديميثوكسيل، وتفاعلات البلمرة [٤١].

والكثير من تراكيب اللاكيزات الكاملة متاحة في الوقت الحاضر [٤٢-٤٤]، مما يساعد في فهمنا للتحفيز. ومع ذلك، لا تزال الآلية المفصلة التي تؤكسد بها اللاكيزات أوساط تفاعلها غير مفهومة تماماً. وبعد اكتشاف مفهوم الوسيط في بداية تسعينيات القرن الماضي [٤٥، ٤٦]، تمت دراسة اللاكيزات دراسة مكثفة لتحليل اللجنين من لب كرافت. واللاكيزات متاحة تجارياً للتطبيقات على المستوى الصناعي، وذلك أساساً لتبيض الدنيم.

(١١,٣) الإنزيمات كمساعدات في العملية Enzymes as Process Aids

تتكون ألياف الخشب أساساً من السليولوز، والهيميسيليولوز (أي الزيلان والجلوكومانان)، واللجنين، والمواد الاستخراجية. ولا تحدث أية تغييرات كيميائية رئيسة في مكونات الألياف في عملية الاستخلاص الميكانيكي للب، في حين أنه في الاستخلاص الكيميائي، إما طهي كرافت (كبريتات) أو السلفيت، فإنه تتم إزالة حوالي ٩٠٪ من اللجنين من الألياف. ويتم تعديل مكونات الهيميسيليولوز أيضاً بصورةٍ مكثفة من خلال الذوبان، والتحلل الجزئي، وإعادة الترسيب [٤٧]. وعليه، تختلف التراكيب الكيميائية والهياكل للألياف المعاملة ميكانيكياً وكيميائياً. والهيكل الأكثر انفتاحاً للألياف الكيميائية مقارنة مع الألياف الميكانيكية يجعلها أكثر عرضة لعمل الإنزيمات عالية الجزيئات. حتى في اللب الكيميائي، مع ذلك، يقتصر عمل الإنزيمات على الأسطح التي يمكن الوصول إليها، أي للدقائق وللسطح الأبعد والمسام التي يمكن الوصول إليها للألياف الطويلة [٤٨]. ولذلك، يمكن اعتبار المعالجة الإنزيمية للألياف طرق تعديل متخصصة للأسطح.

وقد تم تطوير المفاهيم لاستخدام الإنزيمات في تجهيز اللب والورق خلال السنوات العشرين الماضية. ويصف الجدول رقم (١,١١) الفوائد المستهدفة في مختلف التطبيقات. وسوف توصف التطبيقات الرئيسة أدناه.

الجدول رقم (١ , ١١). تطبيقات الإنزيمات في معالجة اللب والورق.

التطبيق	فوائد العملية أو التقنية	الإنزيم	التحديات
معالجة (رقائق) الخشب الأولية	توفير الطاقة في نزع اللحاء	السليوليزات البكتينيزات مخلوط	تغلغل الإنزيمات في طبقة الكامبيوم
معالجة اللب الميكانيكية	توفير الطاقة في تنقية اللب الحراري الميكانيكي (TMP) زيادة مرونة الألياف	السليوبيوهيدروليزات الزيلانيزات	تغلغل الإنزيمات إلى الرقائق
معالجة اللب الكيميائية	انخفاض استهلاك الكيماويات انخفاض استهلاك الطاقة منتجات متخصصة/ ورق عالي الكثافة	إندوجلوكانيز إنزيمات مختلطة إندوجلوكانيزات	الحفاظ على خصائص المتانة التحكم في العملية
تبييض اللب الميكانيكي	توفير الكيماويات منع ارتداد اللمعان	اللاكييز + وسيط	التكلفة ضد الكفاءة
تبييض اللب الكيميائي	لمعان نهائي عالي توفير الكيماويات	الزيلانيزات اللاكييز + مواد وسيطة	التأثير المحدود للزيلانيز الكفاءة والتحلل الحيوي للمواد الوسيطة تكلفة المعالجة
صناعة الورق	تحسين التجفيف سلاسة تشغيل ماكينة الورق	إندوجلوكانيز هيميسليوليزات	التحكم في العملية
نزع الأحبار	زيادة خروج جزئيات الحبر زيادة خروج جزئيات الحبر	سليوليزات مختلطة أميليزات	التحكم في العملية
المواد الذائبة والغروية في مياه العملية	انخفاض مشكلات البقع زيادة قدرة تشغيل ماكينة الورق	ليبيز إستيريزات لاكييز مانانييزات	التحكم في العملية
الأغشية الحيوية (البروتينات والسكريات العديدة)	التحكم في الشحم	إستيريزات وإضافات كيميائية	تنوع مكونات الشحم

(١١,٣,١) استخلاص اللب Pulping

(١١,٣,١,١) استخلاص اللب كيميائياً Chemical Pulping

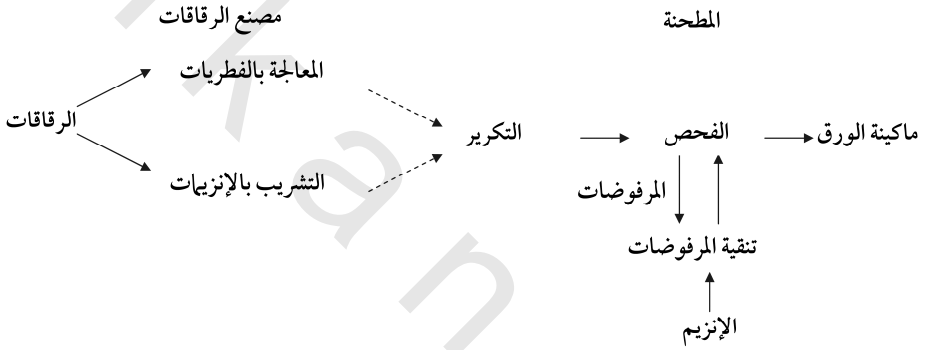
في استخلاص اللب كيميائياً، يتم فصل ألياف الخشب عن بعضها ببعض من أجل جعلها مناسبة لعملية صنع الورق. في عملية استخلاص اللب، تتم اذابة الصفائح الملجننة الوسطى التي تقع بين ألياف الخشب بواسطة الكثير من المواد الكيميائية. وطريقة استخلاص اللب السائدة حالياً هي عملية كرافت، التي تجمع بين القلوية العالية (الرقم الهيدروجيني ١٢-١٤)، والسلفنة، ودرجة الحرارة العالية (١٦٥-١٧٠ درجة مئوية). ويحدث تعديل مكثف للهيميسليوليزات خلال عملية استخلاص اللب. خلال عملية طهي كرافت التقليدية، تتم أولاً إذابة جزء من اللهيميسليوليزات في محلول الطبخ. وفي المراحل اللاحقة، عندما تنخفض قلوية محلول الطبخ، يحدث نقل لجزء من الزيلان المذاب على ألياف السليولوز. في الأخشاب اللينة، تتم إذابة معظم الجلوكومانان وتحليله خلال استخلاص كرافت للب. وهكذا، تزيد كمية الزيلان النسبية في عملية كرافت للب الصنوبر مقارنةً مع ذلك في خشب الصنوبر. تختلف كيمياء الزيلان المتبقي أيضاً عن الزيلان الأصلي في اللب حيث يتم تحويل جزء من حمض الجلوكورونيك إلى حمض الهيكسينورونيك خلال لب كرافت.

بالإضافة إلى الزيلان، تتم إعادة ادمصاص اللجنين جزئياً على الألياف. وقد وجد أن اللجنين يكون مرتبطاً إلى الهيميسليولوز، مشكلاً متراكبات اللجنين-الكربوهيدرات. وعلاوةً على ذلك، يبدو أن الهيميسليولوزات تقيد مرور اللجنين عالي الكتلة الجزيئية إلى خارج جدار خلايا الألياف. ويمكن بالتالي توقع ازالة الهيميسليولوزات، خاصةً الزيلان؛ وذلك لتحسين استخلاص اللجنين المتبقي البني الداكن من اللب في عملية التبييض.

وقد تمت دراسة عدة طرق لزيادة انتشار مواد الطهي الكيميائية في الخشب لتحسين كفاءة عملية استخلاص اللب الكيميائية. تتحكم ظواهر الانتشار والامتصاص، ومسامية وتركيب مصفوفة جدار الخلية، وكذلك الحجم الجزيئي للجزيئات القابلة للاستخراج في تشريب المواد الكيميائية في الخشب وإزالة اللجنين المذاب. ويحد انخفاض مسامية رقائق الخشب من استغلال الإنزيمات عالية الجزيئات لتعزيز تشريب رقائق الخشب بالمواد الكيميائية. وقد وجد، مع ذلك، أن الإنزيمات بما في ذلك الهيميسليوليزات، والبكتينيزات، والسليوليزات لها القدرة على زيادة انتشارية هيدروكسيد الصوديوم في خشب الصنوبر الجنوبي [٤٩]. وتعزى هذه النتيجة إلى إذابة الأغشية بين الأوعية الخشبية، والتي هي المقاوم الرئيس للتدفق في الخشب. ووجد بعد الاستخلاص بالأسيتون والمعالجة الإنزيمية أن اللب يكون أكثر انتظاماً، وله لزوجة وإنتاجية أعلى، وانخفاض الرجيع [٥٠].

(٢ , ١ , ٣ , ١١) استخلاص اللب ميكانيكياً Mechanical Pulping

يستخدم اللب الميكانيكي، الذي يتميز بارتفاع العائد (إلى ٩٥٪)، لإنتاج درجات الورق المحتوية على الخشب مع ارتفاع الكمية والخصائص البصرية الجيدة والقابليه للطباعة. حالياً، يعد التحدي الرئيس لعملية الاستخلاص الميكانيكية هو الحد من استهلاك طاقة التنقية في هذه العملية المكثفة الطاقة. وزاد إبراز مسألة استخدام الطاقة بعد الزيادة الأخيرة في أسعار الطاقة والاهتمامات البيئية. وهي بالتالي قضية أساسية عند تطوير عمليات تقنية جديدة عالية العائد لاستخلاص اللب. وإحدى الطرق للحد من طاقة التنقية هي تعديل المواد الخام عن طريق التقنية الحيوية قبل التنقية. ويوضح الشكل رقم (٢ , ١١) خيارات التقنية الحيوية المختلفة لتوفير الطاقة في عملية استخلاص اللب الميكانيكية.



الشكل رقم (٢ , ١١). معالجات التقنية الحيوية لتوفير الطاقة في عملية استخلاص اللب الميكانيكية.

حالياً، تشمل تطبيقات التقنية الحيوية الرئيسة المتعلقة باستخلاص اللب الميكانيكي استخلاص اللب الموفر للطاقة من رقائق الخشب بالفطريات [٥١، ٥٢]، والحد من البقع باستخدام الميكروبات [٥٣]، وتنقية ألياف اللب الميكانيكية الخشنة بمساعدة الإنزيمات [٥٤-٥٧]. وتم تطوير عملية إنزيمية تعتمد على معالجة اللب الخشن الميكانيكي أو الرجيع باستخدام سليوليزات أحادية المكون في تسعينيات القرن الماضي [٥٥، ٥٨] ويجرى تنفيذ هذه الطريقة للاستخدام الصناعي. وتم التحقق من الطريقة بنجاح على نطاقٍ صناعي مسفرة عن وفورات في الطاقة بحوالي ١٥٪ في تنقية الرجيع، والتي تتطابق مع ٥-٨٪ من إجمالي استهلاك الطاقة [٥٦]. ولم يوجد دليل على أنه تم تحفيز تعديلات شكلية في ألياف اللب الخشن والميكانيكي الحراري خلال فترة تحضين قصيرة مع خليط من السليوليز أو CBH 1 [٥٣]. ويبدو أن عمل الـ CBH 1 يحفز التماسك بين الليفات داخل جدار الألياف مما ينتج عنه تخفيف وكشف في هيكل الألياف. وتم الحفاظ على جودة اللب والخصائص البصرية كما لم تتم ملاحظة أي آثار سلبية على عملية صنع الورق اللاحقة بعد معالجة الـ CBH 1 . كما تم أيضاً الحصول على تكثيف

للتنقية بالمعالجة الإنزيمية الأولية في التجارب التي استخدمت فيها الألياف الزراعية أو المعاد تدويرها كمادة خام [٥٤، ٥٧].

في الآونة الأخيرة، تم أيضاً الحصول على نتائج واعدة عن طريق معالجة رقائق الخشب بإنزيمات مختارة للحد من طاقة التنقية [٥٩، ٦٠]. وتكون قدرة توفير الطاقة أعلى عند تطبيق المعالجة الإنزيمية لرقائق الخشب قبل خطوة التنقية الأولى بدلاً من معالجة رجيع اللب. وللتعديل الفعال لمكونات الخشب في الرقائق بالإنزيمات، مع ذلك، فإنه لابد من خطوة تشريب، يتم فيها إدخال الإنزيمات إلى الأجزاء الداخلية من الرقائق. وتم الحصول على وفورات في الطاقة ما بين ١٠ و٢٥٪ مقارنة مع عمليات اللب الحراري الميكانيكي التقليدية (TMP) في التجارب التي تم فيها معالجة رقائق الخشب اللين أو الصلب بالبكتينيزات، أو السليوليزات، أو الزيلانيزات [٥٩-٦١]. وتظهر دراسات المجهر الإلكتروني الناقل (TEM) لرقائق الخشب الصلب تغيرات أساسية في فصل الألياف وآليات التنقية مقارنةً مع عمليات اللب الحراري الميكانيكي التقليدية. وهكذا، يمكن تحقيق وفورات طاقة مهمة من خلال معالجة الرقائق بالإنزيمات قبل التنقية.

ويمكن استخدام الليبيزات المحللة للدهون الثلاثية إلى الجلسرين والأحماض الدهنية الحرة للحد من مشكلات البقع الناشئة من المواد الاستخراجية المحبة للدهون، وخاصةً في اللب الميكانيكي. وتم استخدام مستحضر ليبيز تجاري، Resinase (نوفوزايم)، صناعياً لتحسين جودة لب خشب المزارع في اليابان [٦٢]. كما وجد أن الدهون الثلاثية من الأنواع المختلفة من اللب يمكن تحليلها بكفاءة باستخدام الليبيزات، مما يحد من الالتصاق ومشكلات البقع، والسماح بالتوفير في استهلاك المواد المضافة والكيماويات النشطة على السطح، وزيادة قوة الشد في اللب [٦٢-٦٥].

وبالإضافة إلى الإنزيمات المحللة، فقد تم استخدام الإنزيمات المؤكسدة، وخاصةً اللاكيزات، لتعديل تركيب وهيكل المواد الاستخراجية المحبة للدهون والماء [٦٦، ٦٧]. تؤدي معالجة اللاكيز إلى بلمرة اللجنانات إلى الألياف ويمكنها أيضاً أن تعدل المواد الاستخراجية المحبة للدهون بدرجة طفيفة. كما ثبت أيضاً أن نظام وسيط اللاكيز (LMS) يكون فعالاً في إزالة الإستيرولات [٦٨]. تمت معالجة أنواع مختلفة من اللب باللاكيز في وجود ١-هيدروكسي بنزوترايازول (HBT) كوسيط للأكسدة والاختزال. كما تمت إزالة معظم المركبات المحبة للدهون، بما في ذلك السيتوستيرول الحرة والمترافقة، والأحماض الدهنية والراتنجية والدهون الثلاثية، بكفاءة بواسطة هذه المعالجة. ولوحظ في نفس الوقت تحسين مهم في لمعان اللب وانخفاض رقم الكابا في اللب المعامل بالـ LMS [٦٩].

(١١,٣,٢) التبييض Bleaching

يتم استخدام التبييض لتحسين خصائص اللون واللمعان للب الميكانيكي والكيميائي. من المهم الحصول على عائدٍ كبير في اللب الميكانيكي، وبالتالي، يتم إجراء تبييض يحافظ على اللجنين باستخدام فوق أكسيد الهيدروجين و/ أو الداي ثيونيت. وفي اللب الكيميائي، يهدف التبيض إلى الإزالة الكلية للجنين المتبقي الموجود في اللب بعد الطهي، دون خفض الوزن الجزيئي للسليولوز. ويمثل اللجنين في اللب غير المبيض عادةً حوالي ١٪ فقط من الوزن الجاف. وخلال عملية الاستخلاص، مع ذلك، يتم تعديل اللجنين كيميائياً وتكثيفه إلى هياكل رديئة التحلل ومصبوغة بدرجة عالية. وفي عمليات التبييض، يتم تحليل اللجنين بشكلٍ تسلسلي واستخلاصه في عدة مراحل باستخدام الأوكسجين، أو الأوزون، أو فوق الأكاسيد وثاني أكسيد الكلور ومواد تبييض [١].

ويمكن استخدام الإنزيمات لتحسين عملية التبييض مباشرةً أو غير مباشرة. في الطريقة غير المباشرة يتم تحسين قابلية اللب للتبييض من خلال عمل الزيلانيزات أو الإنزيمات الأخرى التي تؤثر في استخلاص اللجنين، ويكون التأثير محدوداً. وأكثر نظم التبييض الإنزيمية المباشرة الواعدة هو نظام وسيط اللاكيز، الذي يعمل مباشرة على اللجنين.

(١١,٣,٢,١) التبييض بمساعدة الزيلانيز Xylanase-Aided Bleaching

إن تبييض اللب الكيميائي بمساعدة الزيلانيز هو التطبيق التقني الحيوي الأكثر استخداماً على النطاق الواسع والأفضل تأسيساً في صناعة اللب والورق. يستخدم الزيلانيز كأداة مساعدة في التبييض وتعزز مرحلة الزيلانيز قبل مراحل التبييض الكيميائية اللاحقة من قابلية استخلاص اللجنين في مراحل التبييض اللاحقة. وقد تم اقتراح عدة بدائل، وربما آليات متزامنة لكي تشارك في التبييض بمساعدة الزيلانيز. وقد اقترح أن قابلية اللجنين المرتبط بالألياف للتبييض بواسطة معالجة الزيلانيز تكون نتيجة لتحليل الزيلان المعاد ترسيبه أو إزالة الزيلان من متراكبات اللجنين–الكربوهيدرات في الألياف [٧٠، ٧١]. وقد ذكر أن إزالة الزيلان بواسطة الزيلانيزات من ألياف كرافت للخشب اللين تكشف لجنين السطح [٧٢]. ويشير عمل الزيلانيزات على كلٍ من الزيلان المعاد ترسيبه والمرتبط بالكربوهيدرات إلى أنه ربما لا يكون فقط نوع ولكن أيضاً موقع الزيلان هو المهم في التبييض بمساعدة الزيلانيز.

بسبب التركيب المحتوي على رابطة ثنائية، فإن حمض الهيكسينورونيك يزيد من استهلاك مواد التبييض الكيميائية والبرمنجنات، مما يزيد بوضوح رقم الكابا للب [٧٣]. والتركيب يكون غير مستقر تماماً، ويتحلل بسهولة في ظل الظروف الحمضية، لذلك تم استغلال هذه الخاصية في طرق الإزالة المستخدمة صناعياً. على الرغم من الجهود البحثية واسعة النطاق، فلم يتم توصيف أي إنزيم قادر على إزالة هذا المركب من عمود الزيلان الفقري

حتى الآن. في الآونة الأخيرة، تم تبني أن نشاطاً جانبياً لليبيز تجاري يمكنه أن يقلل من رقم الكابا ومحتوى حمض الهيكسينورونيك في لب الخشب اللين بطريقة كرافت، ولكن لا يزال يتعين توضيح تفاصيل هذه العملية [٧٤]. وتؤدي الإزالة الجزئية للزيلان المستبدل بحمض الهيكسينورونيك بواسطة معالجة الزيلانيز إلى رقم كابا أقل قليلاً. ويرجع هذا التأثير المتواضع إلى الكمية الصغيرة نسبياً من الزيلان التي يتم إزالتها أثناء المعالجة.

يتوافق التبييض بمساعدة الزيلانيز مع أنواعٍ مختلفة من لب كرافت. وقد وجد أن المانانيزات تكون فعالة في تعزيز القابلية للتبييض، ولكنها تعتمد بالفعل على نوع اللب المستخدم [٧٥]. كما وجد أن كلاً من الزيلانيزات الفطرية والبكتيرية تعمل على زيلان اللب مما يؤدي إلى تعزيز القابلية للتبييض [٧٦]. ومع ذلك، تم اقتراح أن بعض الزيلانيزات من العائلة ١١ يمكن أن تكون أكثر فعالية في تعزيز التبييض من زيلانيزات العائلة ١٠ [٧٧]. وحتي الآن لم يثبت أن لربط الزيلانيزات إلى الألياف بواسطة مجالات ربط السليولوز والزيلان (CBD وXBD) أي دور في تعزيز كفاءة التبييض للزيلانيزات [٧٨].

ويمكن استخدام قابلية التبييض المحسنة عن طريق استخدام الزيلانيزات للحد من استهلاك كيماويات التبييض أو زيادة لمعان اللب النهائي. تعتمد الفوائد الناتجة من الإنزيمات على نوع تسلسل التبييض المستخدم وعلى محتوي اللجنين المتبقي من اللب. وفي تسعينيات القرن الماضي، استخدمت مرحلة الزيلانيز لتقليل الحمل البيئي من كيماويات التبييض المعتمدة على الكلور. ويؤدي تقليل متوسط استهلاك الكلور النشط بنسبة ٢٥٪ في مرحلة قبل التبييض أو تقليل استهلاك الكلور الكلي بحوالي ١٥٪ إلى الحد من المكونات المكلورة بنسبة ١٥-٢٠٪، مقاساً كـ AOX، في متدفقات التبييض.

واليوم، يتم استخدام الزيلانيزات صناعياً في كل التسلسلات الخالية من عنصر الكلور (ECF) والخالية من الكلور تماماً (TCF). في تسلسلات ECF، غالباً ما يتم تنفيذ الخطوة الإنزيمية بسبب القدرة المحدودة على إنتاج ثاني أكسيد الكلور. ويسمح استخدام الإنزيمات بالتبيض لقيم لمعان أعلى في حالة عدم استخدام غاز الكلور. وفي تسلسلات TCF، تكون ميزة الخطوة الإنزيمية هي أنها تسمح بتحسين اللمعان، والمحافظة على متانة الألياف، وتحقيق وفورات في تكاليف التبييض [٧٩].

اعتباراً من عام ٢٠٠٧م، يستخدم نحو ٢٠ مصنعاً في أمريكا الشمالية والدول الاسكندنافية الإنزيمات في تبييض اللب بطريقة كرافت. وتحتاج ظروف عملية التبييض الكيميائي من حيث القلوية العالية، وارتفاع درجة الحرارة مجموعة متطلبات خاصة للمعالجة الإنزيمية. وحالياً، توجد منتجات إنزيمية جديدة متاحة تعمل في كلٍ من درجة القلوية العالية ودرجة الحرارة (درجة القلوية ١٠ ودرجة حرارة ٩٠-١٠٠). وكان السعر التقريبي للمعالجة بالزيلينيز في عام ٢٠٠٧م أقل من ٢ دولار أمريكي لكل طن من اللب.

(٢,٢,٣,١١) نظام وسيط اللاكيز لنزع اللجنين للتبييض المباشر

Delignifying Laccase-Mediator System for Direct Bleaching

كان التبييض المباشر للب الكيميائي بنظم الأكسدة المعتمدة على الإنزيمات محل الأبحاث المكثفة منذ اكتشاف الإنزيمات المؤكسدة للجنين في بدايات ثمانينيات القرن الماضي. اليوم، تعد طريقة نزع اللجنين المباشرة الأكثر تقدماً هي نظام وسيط اللاكيز (LMS). في مفهوم الـ LMS، يستخدم اللاكيز لأكسدة مادة كيميائية وسيطة يمكنها إضافياً أن تؤكسد وتحلل اللجنين المرتبط بالألياف. في الدراسات الأولية، تم استخدام وسط تفاعل اللاكيز الشائع ٢،٢'-أزينو-بيس(٣-إيثيل بنزثيازولين-٦-سلفونات) (ABTS) و١-هيدروكسي بنزو ترايأزول (HBT) كمواد وسيطة [٨٠، ٨١]. في وقتٍ لاحق، تم دراسة الكثير من المواد الوسيطة الأخرى بما في ذلك إن-هيدروكسي أسيتانيليدين (NHA) أو مادة أولية مشتقة من الـ NHA تحرر الـ NHA ببطء، وحمض الفيولوريك والـ TEMPO [٨٢-٨٤]. وعادةً ما تحتوي المواد الوسيطة الأكثر فعالية على مجموعات N-OH وظيفية.

وحتى تكون مجدية اقتصادياً للاستعمال التجاري، ينبغي أن تكون المواد الوسيطة متخصصة، ومقبولة بيئياً، وقابلة للتحلل الحيوي. ولذلك، تم اكتشاف عدد من المواد الوسيطة الجديدة ذات تنوع تركيبي كبير. كما تم البحث عن المواد الوسيطة الموجودة بشكلٍ طبيعي بين الفينولات المشتقة من اللجنين والتي يمكن أن توفر مزايا بيئية أو اقتصادية [٨٥]. وتشمل المركبات التي خضعت للاختبار الأسيتوفانيلون، والفانيلين، والسيرينجالدهيد، والأسيتوسيرينجون، و٢،٤،٦-ثلاثي ميثيل الفينول، وحمض البارا-كوماريك، وحمض السينابيك، وحمض السيناباريتيك، وحمض الفيروليك. من بين هذه، وجد أن السيرينجالدهيد والأسيتوسيرينجون هما الأكثر فعالية في LMS لكلٍ من نزع اللجنين وتحلل المواد الاستخراجية المحبة للدهون [٨٦، ٨٧]. وبالإضافة إلى المواد الوسيطة القائمة على النيتروجين، تم بنجاح اختبار مواد وسيطة غير عضوية، مثل متراكبات المعادن الانتقالية، التي يفضل أن تحتوي على الموليبدينوم، للتبييض عن طريق اللاكيز [٨٨، ٨٩]. وتم دراسة آليات نزع لجنين اللب عن طريق اللاكيز بشكلٍ مكثف [٩٠-٩٣].

ووجد أن درجة نزع اللجنين بعد الاستخلاص القلوي تكون عالية وتصل إلى ٤٠٪ [٩٤]. وقد تبين أن نظام الـ LMS يكون قادراً على استبدال إما خطوة نزع اللجنين بالأكسجين أو مرحلة الأوزون [٩٣، ٩٥]. ويمكن الحصول على المزيد من التحسينات في قابلية التبييض من خلال الجمع بين معالجة الزيلانيز وتبييض الـ LMS بالتتابع [٩٦، ٩٧]. وقد وجد أن الجمع بين معالجة الزيلانيز وتبييض الـ LMS في مرحلة واحدة يكون غير فعالاً، على ما يبدو بسبب تثبيط الزيلانيز من قبل المادة الوسيطة [٩٨]. بالإضافة إلى الـ LMS، تم اقتراح نظم الأكسدة المساعدة بالإنزيمات، مثل نظام الأكسدة بواسطة الهيدروليز (HOS) وغيره من النظم الكيميائية الإنزيمية بطيئة التحرر من أجل تبييض اللب الكيميائي [٩٩، ١٠٠].

(١١,٣,٣) صناعة الورق Paper Making

في صناعة الورق، يتم تكوين الورق من اللب، والمواد الكيميائية المختلفة، والأصباغ في ماكينة الورق. بعد إعداد المخزون، تحتوي ماكينة الورق عادةً على تشكيل النسيج، والضغط، والتجفيف، والتحجيم، وعمليات وحدة الصقل. وهناك حاجة إلى كميات كبيرة من المياه في تشكيل نسيج ورق متجانس من طين اللب في ماكينة الورق. وتكون الكفاءة العالية مطلوبة من جميع عمليات الوحدة بسبب السرعة العالية للإنتاج.

ويمكن استخدام الإنزيمات لتعديل خصائص صناعة الورق في اللب الكيميائي، والميكانيكي، والمعاد تدويره. ويعد استخدام الإنزيمات للحد من الحاجة إلى التنقية وزيادة الصرف (أي إزالة الماء) من اللب الكيميائي من التطبيقات المحتملة لاستغلال قدرة الإنزيمات على تعديل سطح ألياف اللب. وقد تم بالتفصيل دراسة آثار السليوليزات الفردية على خصائص لب كرافت المبيض أو غير المبيض [٩٧، ١٠١]. ووجد أن السلوبيوهيردوليزات من الترايكوديرما ريسي (CBH) ليس لها سوى تأثير متواضع على لزوجة اللب، في حين تقلل الإندوجلوكانيزات الرئيسة (EG)، وخاصة EG II، اللزوجة بصورةٍ هائلة وبالتالي خصائص المتانة بعد التنقية. كما وجد أن معالجة لب كرافت الصنوبر بالإندوجلوكانيزات من الترايكوديرما ريسي EG I وEG II تحسن قابلية التبييض بدرجة كبيرة ولكن في الوقت نفسه تم إضعاف خصائص متانة اللب. ويرجع انخفاض اللزوجة ربما إلى مهاجمة الإندوجلوكانيزات لمناطق السليولوز غير المتبلورة، وخاصةً في مناطق الألياف المعيبة وغير النظامية [١٠١].

كما تم ذكر الأثر الإيجابي للترايكوديرما ريسي CBH I على قابلية الطرق ومن ثم على تطور خصائص ارتباط لب كرافت الصنوبر المبيض بالـ ECF في التنقية [١٠٢]. وتتوافر السليوليزات التجارية أحادية المكون ومخلوطات السليوليز-الهيميسليوليز لتحسين قابلية اللب للطرق، وصرف وتشغيل ماكينة الورق. وتكون تطبيقات الإنزيمات هذه مناسبة لبعض درجات الورق الخاص أو لبعض الاحتياجات الخاصة في بعض الأحيان في مصانع الورق. ويحتاج الاستخدام الناجح للمستحضرات المحتوية على السليوليز إلى عناية خاصة ما يتعلق باختيار الإنزيم، وظروف المعالجة الإنزيمية، والتحكم في العملية.

ويعد التقليل من استخدام المياه وتصريف المتدفقات هو تحدي مستمر في صناعة الورق بسبب المتطلبات البيئية والتشريعية لتقليل استهلاك المياه العذبة. وثمة مشكلة رئيسة في الحد من استخدام المياه وهي تراكم المواد الذائبة والغروية (DCS) في مياه العملية. وتتكون الـ DCS أساساً من الهيميسليوليزات، والبكتينات، وراتنجات الخشب المتناثرة، والليجنانات، واللجنين الذائب. ويؤثر محتوى الـ DCS وتكوين مياه العملية على تشغيل الآلات الورق وجودة الورق، ويحدد أيضاً الكفاءة المطلوبة لتنقية مياه العملية.

ووجد أن المعالجة بالبكتينيز تقلل الطلب الكاتيوني للماء الأبيض الموجب بحوالي ٦٠٪ [١٠٣-١٠٦]. بذلك، يتم الحصول على وفورات في الكيماويات الكاتيونية (الشبة، وعوامل الاحتفاظ، وعوامل المتانة، والنشا) وتحسين تشغيل آلات الورق في المحاولات على مستوى المطحنة مع البكتينيز [١٠٧، ١٠٨]. ويمكن استخدام المانانيزات لتحليل الجلوكومانانات، وتثبيت الراتنج الغروي في مياه عملية اللب الميكانيكي [١٠٩]. ونتيجة للمعالجة الإنزيمية، فقد ثبت أن جزيئات الراتنج يحدث لها عدم استقرار وتعلق على الألياف كجزيئات فردية. ويمكن تعديل التركيب الكيميائي للجالاكتوجلوكومانان الموجود في مياه الـ TMP بواسطة إنزيم أسيتيل جلوكومانان إستيريز، والذي يكون قادراً على شق مجموعات الأسيتيل من الجلوكومانان المتبلمر [٥]. ووجد أن نزع مجموعة الأسيتيل من الجلوكومانان القابل للذوبان يؤدي إلى انخفاض الذوبان والامتزاز اللاحق للجلوكومانان على الألياف [١١٠].

(٤ ,٣ ,١١) الورق المعاد تدويره وإزالة الأحبار Recycled Paper and Deinking

يزيد استخدام الورق المسترجع بشكلٍ متزايد لطباعة الصحف، والمناديل الورقية، والدرجات العليا من أوراق الرسم. يجب إزالة الأحبار من الورق المسترجع، أي، إعادة الاستخلاص والتنظيف من الأوساخ والحبر قبل أن يتم إعادة استخدامه في صناعة الورق. في إزالة الأحبار، يتم فصل جزيئات الحبر وإزالتها من الألياف عن طريق الجمع بين عمليات ميكانيكية وكيميائية. وقد أظهرت الإنزيمات، وخاصةً الأميليزات والسليوليزات، أنها تكون فعالة في تحسين انفصال الحبر من ألياف الورق المسترجع المطلي وغير المطلي. وقد تم دراسة استخدام مخلوطات السليوليز والهميسيليوليز، وكذلك الأميليزات في إزالة الأحبار على مستويات المختبرات، والمستوى النصف صناعي، والصناعي [١١١-١١٦].

ويمكن الحصول على التأثير الإيجابي للإنزيمات في تحسين انفصال الحبر من خلال نهجين أساسيين: عن طريق تحرير الإنزيمات لجزيئات الحبر من أسطح الألياف باستخدام الإنزيمات المحللة للكربوهيدرات مثل السليوليزات، أو الهيميسليوليزات، أو البكتينيزات، أو عن طريق تحليل ناقل الحبر أو طبقة الطلاء. ويعتقد أنه في إزالة الأحبار بمساعدة الإنزيم فإن التحليل الإنزيمي لناقل الحبر، وطبقة النشا، أو أسطح الألياف يحرر جزيئات الحبر التي تكون كبيرة بما يكفي لإزالتها عن طريق إزالة الأحبار العائمة. واستخدام الإنزيمات في إزالة الأحبار من الورق المسترجع هو واحد من أكثر التطبيقات الإنزيمية فائدة في صناعة اللب والورق وهي تستخدم بالفعل على النطاق الصناعي.

وتتأثر أيضاً نوعية الورق المعاد تدويره بواسطة "اللاصقات" التي تحدث خلال عملية صنع الورق. وهذه يمكن أن تظهر كبقع أو تسبب نتوءات خارجة وتقلل من كفاءة آلة الورق؛ بسبب أعطال التنظيف الإضافي الناجمة. ويمكن أن تحتوي اللاصقات على بقع الخشب، والزيوت، وعوامل التحجيم، والمواد الكيميائية المضادة للرغوة، أو البولي فينيل أسيتات (PVA)، وهي مادة تستخدم على نطاقٍ واسع للملصقات ذاتية اللصق. وقد تم تطوير مستحضر إنزيمي تجاري يحتوي على إستيريز يهاجم الـ PVA ويستخدم حالياً في المستوى الصناعي لمكافحة اللاصقات [١١٧].

(١١,٣,٥) التحكم في الشحم Slime Control

الإنزيمات هي عوامل محتملة للتحكم في الأغشية الحيوية ويمكن أن تعمل ضد مختلف مكونات شحوم آلة الورق، مثل البروتينات، والدهون، والكربوهيدرات، أو مركبات البقع. ومن الممكن تعزيز تأثيرها، من خلال المعالجات التآزرية بمخلوطات من الإنزيمات المحللة للسكريات العديدة مع البروتيزات والليبيزات الفعالة أو مع المواد الكيميائية التي تهلهل تركيب الأغشية الحيوية. والمشكلة الرئيسة في استخدام إنزيمات خاصة تحليلية هي التغير في تكوين الشحوم والسكريات العديدة للشحوم [١١٨].

وقد وجد أن الكثير من الإنزيمات التحليلية تظهر قدرة على تحليل الأغشية الحيوية. ومع ذلك، فإن معظم المنتجات الصناعية الناجحة للتحكم في الشحوم واللاصقات تعتمد على مخلوطات من عدة أنشطة إنزيمية، ويتم تطوير تكوينها بالتجربة حتى على أساس كل حالة على حدة. وتشمل الأنشطة ذات الأهمية العملية البروتيزات، وربما متحدة مع غيرها من الأنشطة [١١٩-١٢١].

(١١,٣,٦) التطبيقات الأخرى Other Applications

إن تكوين تقشر أكسالات الكالسيوم هو مشكلة حالية في صناعة اللب والورق. يتواجد حمض الأكساليك والكالسيوم في الخشب ولكن حمض الأكساليك يتكون أيضاً من بوليمرات الخشب خلال التبييض عن طريق الأكسدة. وتسبب الدرجة العالية من غلق النظام تراكم حمض الأكساليك والكالسيوم، مما يزيد من مخاطر التقشر الداخلي لأكسالات الكالسيوم في الأنابيب، والمرشحات، ومبادلات الحرارة. وتوفر إزالة الأوكسالات بالإنزيمات المحللة للأوكسالات وسيلة لحل المشكلة. وقد تم اختبار الإنزيمات الجديدة المحللة للأوكسالات، مثل أوكسالات أوكسيديز وأوكسالات ديكربوكسيليز، لهذا التطبيق. وتنتج المشكلات الرئيسة، مع ذلك، من المثبطات الموجودة في الراشحات، بما في ذلك الحديد، والكالسيوم، والعوامل الحاجبة، والمواد الإستخراجية [١٢٢].

(٤ , ١١) الإنزيمات لتصميم المنتجات Enzymes for Product Design

(١ , ٤ , ١١) الهندسة الإنزيمية للألياف Enzymatic Fiber Engineering

إن تخصصية الإنزيمات تجعلها مناسبة خاصةً بالنسبة لهندسة كلٍ من اللب الكيميائي والميكانيكي. ويمكن استخدام التعديل الموجه لأسطح الألياف بواسطة المعالجات الإنزيمية أو الكيميائية والإنزيمية المزدوجة لتحسين خصائص الألياف أو لإنشاء خصائص جديدة تماماً لمختلف التطبيقات. وليس من المستغرب أن هذا يعدُّ واحد من أكثر المناطق نمواً في الصناعة القائمة على الألياف. كما يعكس تعديل الألياف اتجاه استخدام وسائل التقنية الحيوية لتصميم المنتجات وليس لتحسين العملية.

(٢ , ٤ , ١١) الألياف الوظيفية المضافة القيمة Functionalized, Value-Added Fibers

تم فتح آفاق جديدة في استخدام الخشب أو الألياف غير الخشبية عن طريق إدخال خصائص القيمة المضافة إلى الألياف. والخيار المثير للاهتمام هو التعديل الموجه لأسطح الألياف عبر التكوين الإنزيمي للشقوق بواسطة الإنزيمات المؤكسدة. من حيث المبدأ، فإن بوليمرات السليولوز، والهيميسليولوزات، واللجنين تكون هي الهدف الرئيس في مواد الألياف والتي يمكن من خلالها ربط مكون وظيفي إلى مادة الألياف. حالياً، تعتمد واحدة من أكثر طرق المعالجة الكيميائية الإنزيمية الواعدة على استخدام اللجنين كمصفوفة رابطة للارتباط المصمم للمجموعات الوظيفية الجديدة إلى اللب [١٢٣-١٢٦]. تنشط الإنزيمات المؤكسدة، مثل اللاكيزات أو البيروكسيديزات، لجنين السطح في الألياف التي تحتوي على اللجنين. والتفاعل الرئيس للاكيزات والفينول أوكسيديزات الأخرى هو تكوين شقوق فينولية أو كاتيونية [١٢٧، ١٢٨]. وبسبب نشاط التفاعل العالي لهذه الشقوق إما مع بعضها بعضاً أو مع وسط تفاعل ثانوي، فإنه يمكن أن تحدث تفاعلات مثل البلمرة، وتفكيك البلمرة، والبلمرة التعاونية، والتطعيم. وتكوين الشقوق هذه (أي تنشيط سطح الألياف) هو الخطوة الأولى في توظيف الألياف عندما يكون الهدف هو إدخال خصائص القيمة المضافة إلى الألياف.

بعد التكوين الإنزيمي للشقوق، يمكن تطعيم مكونات كيميائية خاصة لتكييف خصائص الألياف. وقد تم سابقاً استغلال التنشيط القائم على الشقوق للجنين المعزول واللجنين السطحي في الألياف في تصنيع ألواح الألياف [١٢٩-١٣٢]. ومع ذلك فإن التوظيف الإنزيمي لأسطح الألياف، يقدم الكثير من الاحتمالات. وعن طريق اختيار المركب الذي سوف يتم ربطه، يمكن إدخال مجموعة متنوعة من الخصائص الوظيفية، على سبيل المثال، تعديل الشحنة، وطبيعة التفاعل مع الماء، والنشاط المضاد للميكروبات، أو التوصيل، مما يتيح خيارات لتحسين خصائص صناعة الورق القائمة أو إنشاء خصائص جديدة تماماً للألياف [١٢٣-١٢٦]. وميزة الطريقة

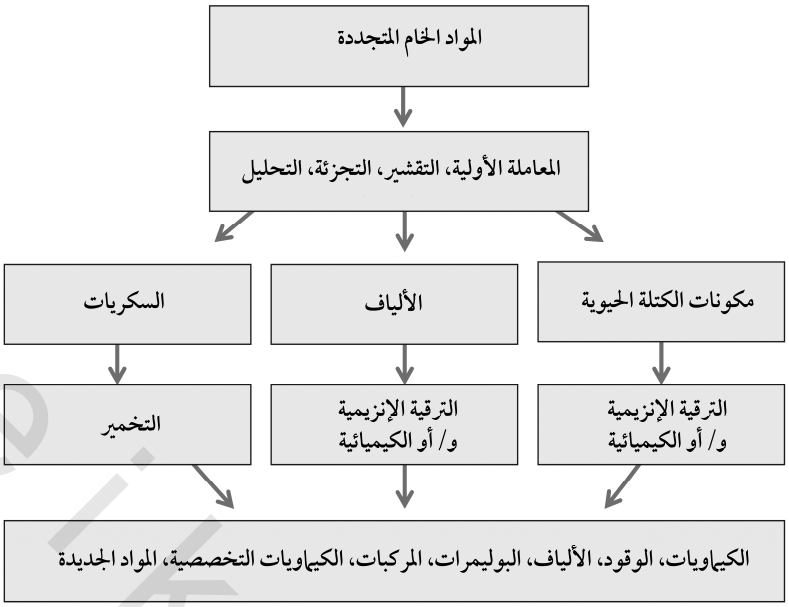
القائمة على الإنزيمات، بالمقارنة مع الطرق الكيميائية البحتة، هي تخصصية السطح والحفاظ على الخصائص الكيميائية والفيزيائية المهمة للألياف، مثل المتانة. ويمكن تعديل مختلف الألياف المحتوية على اللجنين (كرافت غير المبيض، والـ CTMP والـ TMP المبيضة، وغير المبيضة) بهذه الطريقة الجديدة.

وثمة نهج آخر مثير للاهتمام في تعديل الألياف وهو ربط مجموعات وظيفية على أسطح السليولوز باستخدام الزيلوجلوكانات المعدلة كيميائياً أو إنزيمياً كناقلات [١٣٣، ١٣٤]. في هذا النهج يتم بداية تعديل سكريات الزيلوجلوكان الأحادية (XGO) وبعد ذلك ضمها إلى الزيلوجلوكان البوليمري (XG) باستخدام إنزيم زيلوجلوكان إندو-ترانس جليكوزيليز (XET). وحيث إن الزيلوجلوكانات لها انجذاب عالٍ بشكلٍ طبيعي تجاه السليولوز، يتحقق تعديل السطح الخاص للألياف عن طريق امتصاص الزيلوجلوكانات المعدلة على أسطح الألياف. وتحفز الـ XET شق وإعادة التحام سلاسل الزيلوجلوكان. في الخطوة الأولى يحفز الإنزيم شق الرابطة الجليكوسيدية مع التكوين اللاحق لمركب وسيط من جليكوزيل-إنزيم التساهمي. عند تحليل المركب الوسيط جليكوزيل-إنزيم يتم نقل شاردة الجيكوزيل إلى متقبل للكربوهيدرات [١٣٤، ١٣٥].

ويكون انجذاب الزيلوجلوكان إلى السليولوز عالياً ولا يعتمد إلى حدٍ كبير على درجة الأس الهيدروجيني، ودرجة حرارة الارتباط، والوزن الجزيئي، والتكوين الدقيق لسكر الزيلوجلوكان. وقد استخدم التصاق الزيلوجلوكان بنجاح لزيادة متانة الصفائح الورقية. ويمكن انجذاب الزيلوجلوكان العالي أيضاً من ارتباط الشوراد الكيميائية على أسطح السليولوز في مختلف الظروف دون انقطاع الألياف الفردية أو مصفوفة الألياف. وتتيح الطريقة إدماج مجموعة واسعة من المجموعات الكيميائية على أسطح الألياف عن طريق الزيلوجلوكانات. كما تم تصور استخدام هذه الطريقة لتطوير الورق ومواد صناعة الورق الجديدة وعالية الأداء [١٣٣].

(١١,٥) مفاهيم المصفاة الحيوية Biorefinery Concepts

إن المصفاة الحيوية المتكاملة هي مفهوم شامل حيث يتم تحويل المواد الأولية من الكتلة الحيوية إلى مجموعة من المنتجات القيمة. تجمع المصافي الحيوية وتدمج مختلف التقنيات، بما في ذلك أيضاً خطوات عملية التقنية الحيوية، من أجل الاستفادة من جميع المكونات في الكتلة الحيوية. والهدف الرئيس للمصفاة الحيوية المتقدمة هو زيادة توافر واستخدام الطاقة الحيوية والمنتجات القائمة على الحيوية عن طريق تنفيذ تقنيات إنتاج مبتكرة، وسليمة بيئياً، وفعالة التكلفة لإنتاج مجموعة متنوعة من المنتجات. وتوفر المواد الخام اللجنوسليولوزية (الخشب والنباتات السنوية) مصدراً واسعاً ليس فقط لمنتجات الألياف الحالية، ولكن أيضاً لعدد كبير من المواد الوسيطة، والكيماويات التخصصية، والوقود (الشكل رقم ١١,٣).



الشكل رقم (٣, ١١). تطوير الكتلة الحيوية.

تكتسب عملية التحويل الحيوي والتنقية الحيوية زخماً كعمليات تجارية، ويمكن أن يأخذا مكانهما قريباً جنباً إلى جنبٍ مع عمليات استخلاص اللب التقليدية في تحويل المواد الأولية اللجنوسليولوزية إلى منتجات ذات قيمة أعلى. ويثير إنتاج وقود الإيثانول من المواد الخام السليولوزية الاهتمام المتزايد لأسبابٍ بيئية، وسياسية، واقتصادية. وقد أدى العرض المحدود للوقود الحفري إلى الجهود البحثية المهمة والإنجازات الأخيرة في تعزيز مصادر الطاقة المتجددة. ويسمح التحول إلى مصادر الطاقة المتجددة للأنشطة البشرية بأن تصبح محايدة بالنسبة الكربون عن طريق إعادة تدوير الكربون من النباتات ويقلل من انبعاثات ثاني أكسيد الكربون، مما يحد من ظاهرة الاحتباس الحراري. ويعدُّ استخدام الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية لإنتاج الإيثانول، على سبيل المثال، هو تطوير ضروري من الاستخدام الحالي للمحاصيل الزراعية (أي الوسائط القائمة على النشا). وتنتج مواد الكتلة الحيوية الخام في المقام الأول من الزراعة، والغابات أو منتجات النفايات القائمة على الخشب أو من محطات الطاقة المخصصة. وبعد تحليل الكتلة الحيوية الخام إلى الكربوهيدرات (عادة سكريات الجلوكوز والبنتوز)، يمكن تخميرها إلى إيثانول أو ناقلات الطاقة الأخرى.

ويمكن استخدام المنتجات الكيميائية المشتقة من البوليمرات والمكونات اللجنوسليلوزية في عددٍ كبير من التطبيقات. والهدف هو تطوير أساليب وتطبيقات لكلٍ من المنتجات كبيرة الحجم ومنتجات الاستخدام الخاص التي تنتج من بوليمرات الخشب الرئيسة، والسليولوز، والهيميسليولوز، ومواد الخشب الاستخراجية، واللجنين.

ويمكن استغلال أو تعديل خصائص الهيميسليولوز واستخدامها في الأغشية، والطلاء، والمغذيات، ومنتجات الألياف، أو منتجات القيمة المضافة الأخرى. ويمكن تطوير مواد كيميائية قائمة على السليولوز جديدة ومحسنة ذات صفات متخصصة باستخدام الطرق بمساعدة الإنزيمات. كما يمكن استخدام مواد الخشب الاستخراجية كإضافات في مختلف التطبيقات في اللب والورق، والطعام، والمستحضرات الدوائية، وصناعات مستحضرات التجميل. وتشمل أكثر التطبيقات الواعدة لمشتقات اللجنين المواد اللاصقة، والمواد المضادة للاكسدة، وعوامل الانتشار، والمواد الكيميائية الوسيطة. كما سيتم أيضاً ترسيخ تعديلات القيمة المضافة للمركبات الموجودة في اللحاء والمواد الأخرى المتبقية. وسوف يؤدي هذا النهج إلى عمليات جديدة ومتطورة وتقنيات لتحويل الخشب إلى منتجات ذات قيمة مضافة عالية، محايدة لثاني أكسيد الكربون، "خضراء"، وقابلة للتحلل الحيوي.

(٦, ١١) الاستنتاجات Conclusions

حالياً، يتم استخدام الإنزيمات كعوامل مساعدة في صناعة اللب والورق، مما يؤدي إلى تحقيق وفورات في استهلاك الطاقة والمواد الكيميائية. وتشمل التطبيقات الثابتة التبييض بمساعدة الإنزيمات، وإزالة الأحبار، والتنقية، والتحكم في البقع. وبشكلٍ عام، فإن تنفيذ مراحل عملية التقنية الحيوية حتى المستوى الصناعي كان بطيئاً. ومن أجل أن تكون مقبولة على النطاق الصناعي، يجب أن تتفوق التطبيقات الإنزيمية على الطرق الكيميائية التقليدية وأن تؤدي إلى مزايا اقتصادية دون تغيير جودة المنتج. ويبدو أن التطبيقات الجديدة للإنزيمات في صناعة اللب والورق سوف توجد في مجال التعديل الموجه للألياف للمنتجات المتخصصة. وتقدم المواد الخام اللجنوسليولوزية (الخشب والنباتات السنوية)، مع ذلك، مصدراً متزايد الأهمية ليس فقط لمنتجات الألياف الحالية، ولكن أيضاً بالنسبة لعدد كبير من السلع الوسيطة، والمواد الكيميائية المتخصصة، والوقود. وهكذا، فإن تطوير محفزات حيوية فعالة لهذه التطبيقات يمثل تحدياً لصناعة التقنية الحيوية. وتنطبق المعرفة المتولدة في الإنزيمات اللجنوسليولوزية المنطبقة في الوقت الحاضر على صناعات النسيج، والمنظفات والأعلاف وكذلك صناعات اللب والورق، أيضاً على هذه الأهداف الجديدة.

المراجع References

[١] O'Sullivan, A.C. (1997) Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, **4** (3), 173-207.

[٢] Hult, E.-L., Iversen, T., and Sugiyama, J. (2003) Characterization of the supermolecular structure of cellulose in wood pulp fibres. *Cellulose*, **10** (2), 103-110.

[٣] Ståhlberg, J. (1991) Functional organization of cellulases from *Trichoderma reesei*. PhD Thesis, Uppsala, Sweden.

[٤] Van Tilbeurgh, H., Clayssens, M., Bhikhabhai, R., and Pettersson, G. (1986) Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Separation of functional domains. *FEBS Lett.*, **264,** 223-227.

[٥] Tomme, P., van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T., and Claeyssens, M. (1988) Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM9414: analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.*, **170,** 575-581.

[٦] Linder, M. and Teeri, T. (1997) The roles and function of cellulose-binding domains, *J. Biotechnol.* **57,** 15-28.

[٧] Linder, M. and Teeri, T. (1997) The roles and function of cellulose-binding domains. *J. Biotechnol.*, **57,** 15-28.

[٨] Teleman, A., Harjunpää, V., Tenkanen, M., Buchert, J., Hausalo, T., Drakenberg, T., and Vuorinen, T. (1995) Characterisation of 4-deoxy-β-L-*threo*-hex-4-enopyranosyluronic acid attached to xylan in pine kraft pulp and pulping liquor by 1 H and 13 C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, **272,** 55-71.

[٩] Irwin, D., Jung, E., and Wilson, D. (1994) Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 763-770.

[١٠] Gilbert, H. and Hazlewood, G. (1993) Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.*, **39,** 187-194.

[١١] Sakka, K., Kojima, Y., Kondo, T., Karita, S., Ohmiya, K., and Shimada, K. (1993) Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium xynA* gene encoding xylanase A: identification of catalytic and cellulose binding domains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57,** 273-277.

[١٢] Rixon, J., Clarke, J., Hazlewood, G., Hoylamd, R., McCarthy, A., and Gilbert, H. (1996) Do the non-catalytic polysaccharide-binding domains and linker regions enhance the biobleaching properties of modular xylanases? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46,** 514-520.

[١٣] Stålbrand, H., Saloheimo, A., Vehmaanperä, J., Henrissat, B., and Penttilä, M. (1995) Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae*-Saccharomyces cerevisiae of a *Trichoderma reesei* β-mannanase genec ontaining a cellulose binding domain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61,** 1090-1097.

[١٤] Tenkanen, M., Buchert, J., and Viikari, L. (1995) Binding of hemicellulases on isolated polysaccharide substrates. *Enzyme Microb. Technol.*, **17,** 499-505.

[١٥] Sabini, E., Schubert, H., Murshudov, G., Wilson, K., Siika-aho, M., and Penttilä, M. (2000) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a *Trichoderma reesei* β-mannanase from glycoside hydrolase family 5. *Acta Cryst.*, **D56,** 3-13.

[١٦] McCleary, B. (1991) Comparison of endolytic hydrolases which depolymerise 1,4-beta-D-mannan, 1,5-alpha-L-arabinan and 1,4-beta-D-galactan, in *Enzymes in Biomass Conversion*, vol. **460,** Chapter 34 (eds M. Himmel and G. Leatham), ACS Symposium Series, Oxford University Press, New York, pp. 437-449.

[١٧] Coughlan, M. and Hazlewood, G. (1993) β-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **17,** 259-289.

[١٨] Spanikova, S., and Biely, P. (2006) Glucuronoyl esterase-Novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune. FEBS Lett.*, **580,** 4597-4601.

[١٩] Grishutin, S., Gusakov, A., Markov, A.V., Ustinov, B., Semenova, M., and Sinitsyn, A.P. (2004) Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Sub.*, **1674,** 268-281.

[٢٠] Hasper, A.A., Dekkers, E., van Mil, M., van de Vondervoort, P., and de Graaff, L. (2002) EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68,** 1556-1560.

[٢١] Kaku, T., Tabuchi, A., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., and Hoson, T. (2002) Action of xyloglucan hydrolase within the native cell wall architecture and its effect on cell wall extensibility in azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.*, **43,** 21-26.

[٢٢] Rose, J.K., Braam, J., Fry, S.C., and Nishitani, K. (2002) The Xth family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.*, **43,** 1421-1435.

[٢٣] Brumer, H., Zhou, Q., Baumann, M.J., Carlsson, K., and Teeri, T. (2004) Activation of crystalline cellulose surfaces through the chemoenzymatic modification of xyloglucan. *J. Am. Chem. Soc.*, **126,** 5715-5721.

[٢٤] Hatakka, A. (1994) Lignin modifying enzymes from selected white rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.*, **13,** 125-135.

[٢٥] Arbeloa, M., de Leseleuc, J., Goma, G., and Pommier, J.-C. (1992) An evaluation of the potential of lignin peroxidases to improve pulps. *Tappi J.*, **75,** 215-221.

[٢٦] Paice, M., Reid, I., Bourbonnais, R., Archibald, F., and Jurasek, L. (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.,* 260-265.

[٢٧] Kondo, R., Harazono, K., and Sakai, K. (1994) Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase secreted from Phanerochaete sordid YK-624. *Appl. Environ. Microb.,* **60,** 4359-4363.

[٢٨] Hammel, K.E., Jensen, Jr. K.A., Mozuch, M.D., Landucci, L.L., Tien, H., and Pease, E.A. (1993) Lignolysis by a purified lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.,* **268,** 12274-12281.

[٢٩] Piontek, K., Glumoff, T., and Winterhalter, K. (1993) Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidise from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett.,* **315,** 119-124.

[٣٠] Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H., and Gold, M.H. (1993) Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *J. Biol. Chem.,* **268,** 4429-4440.

[٣١] Hofrichter, M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.,* **30,** 454-466.

[٣٢] Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T., and Hatakka, A. (1999) Coupling of manganese peroxidise-mediated lipid peroxidation with destruction with nonphenolic lignin model compounds and 14C-labeled lignins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **259,** 212-219.

[٣٣] Hatakka, A. (2001) Biodegradation of lignin, in *Biopolymers. Vol 1: Lignin, Humic Substances and Coal* (eds M. Hofrichter and A. Steinbuchel), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 129-180.

[٣٤] Martiné z, D., Larrando, L., Putnam, N., Sollewijn-Gelpke, M., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., Coutinho, P., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., and Rokshar, D. (2004) Genome sequence of the lignocelluloses degrading, fungus *chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.,* **22** (6), 695-700.

[٣٥] Martinez, A. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin degrading heme peroxidises. *Enzyme Microb. Technol.,* **30,** 425-444.

[٣٦] Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1999) Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. *J. Biol. Chem.,* **274,** 10324-10330.

[٣٧] Perez-Boada, M., Ruiz-Duenas, F.J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martinez, M.J., Piontek, K., and Martinez, A. (2006) Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J. Mol. Biol.,* **354,** 385-402.

[٣٨] Thurston, C. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology,* **140,** 19-26.

[٣٩] Bao, W., O'Malley, D.M., Whetten, R., Sederoff, R.R., and Stahmann (1993) A laccase associated with lignification in Loblolly pine xylem. *Science,* **260,** 672-674.

[٤٠] Leatham, G.F. and Stahmann, M.A. (1981) Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.,* **125,** 147-157.

[٤١] Youn, H.-D., Hah, Y.C., and Kang, S.O. (1995) Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiol. Lett.,* **132,** 183-188.

[٤٢] Bertrand, T., Jolivalt, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., and Mougin, C. (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry,* **41,** 7325-7333.

[٤٣] Piontek, K., Antorini, M., and Choinowski, T. (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.,* **277,** 37663-37669.

[٤٤] Hakulinen, N., Kiiskinen, L.-L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., and Rouvinen, J. (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat. Struct. Biol.,* **9,** 601-605.

[٤٥] Bourbonnais, R. and Paice, M. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates-An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.,* **267,** 99-102.

[٤٦] Bourbonnais, R. and Paice, M. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2′-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) applied. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **36,** 823-827.

[٤٧] Stenius, P. (2000) *Forest Products Chemistry* (ed. P. Stenius), Finnish Paper Engineers'Association, Helsinki, p. 350.

[٤٨] Suurnäkki, A., Heijnesson, A., Buchert, J., Tenkanen, M., Viikari, L., and Westermark, U. (1996) Location of xylanase and mannanase action in kraft fibres. *J. Pulp Pap. Sci.*, **22** (3), J78-J83.

[٤٩] Richardson, J., Wong, K., and Clark, T. (1998) Modification of mechanical pulp using carbohydrate-degrading enzymes. *J. Pulp Pap. Sci.*, **24,** 125.

[٥٠] Jacobs, C., Venditti, R., and Joyce, T. (1998) Effects of enzymatic pre-treatment on the diffusion of sodium hydroxide in wood. *Tappi J.*, **81,** 260-266.

[٥١] Akhtar, M., Blanchette, R., Myers, G., and Kirk, T. (1998) *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry* (eds R.A. Young and M. Akhtar), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 309-340.

[٥٢] Hakala, T.K., Maijala, P., Konn, J., and Hatakka, A. (2004) Evaluation of novel wood rotting polypores and corticioid fungi for the decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies)* wood. *Enzyme Microb. Technol.*, **34,** 255-263.

[٥٣] Farrell, R., Hata, K., and Wall, M. (1997) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. **57** (ed. T. Scheper), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 197-212.

[٥٤] Bajpai, P., Mishra, S., Mishra, O.M., Kumar, S., and Bajpaj, P.K. (2006) Use of enzymes for reduction in refining energy-laboratory studies. *Tappi J.*, **5** (11), 25-32.

[٥٥] Pere, J., Siika-aho, M., and Viikari, L. (2000) Biomechanical pulping with enzymes: response of coarse mechanical pulp to enzymatic modification and secondary refining. *Tappi J.*, **83,** 1-8.

[٥٦] Pere, J., Ellmén, J., Honkasalo, J., Taipalus, P., and Tienvieri, T. (2002) Enhancement of TMP reject refining by enzymatic modification of pulp carbohydrates-a mill study, in *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* (eds L. Viikari and R. Lantto), Elsevier Science B.V, Amsterdam, pp. 281-290.

[٥٧] Zhao, J., Li, X., Qi, Y., and Gao, P. (2004) Alkaline peroxide mechanical pulping of wheat straw with enzyme treatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **112,** 13-23.

[٥٨] Pere, J., Liukkonen, S., Siika-aho, M., Gullichsen, J., and Viikari, L. (1996) Use of purified enzymes in mechanical pulping, in *Proceedings of the Tappi Pulping Conference, Nashville, TN, October 27-31*, TAPPI Press, Atlanta, GA, pp. 693-696.

[٥٩] Pere, J., Ellm é n, J., Gullichsen, J., and Viikari, L. (2004) Impregnation of chips with enzymes for enchanced mechanical pulping, paper presented at the 9th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Durban, South Africa, 10-14 October, pp. 27-28.

[٦٠] Peng, F. and Ferritsius, R. (2003) Mechanical pulping with pectinase pretreatment of wood chips, paper presented at the International Mechanical Pulping Conference, pp. 335-340.

[٦١] Hoddenbagh, J.M., Meyer, V., Petit-Conil, M., and Tolan, J. (2007) Reducing chip refining energies by enzymatic treatment of hardwood chips prior to refining, paper presented at the 10th International Congress of Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Abstracts, Madison, Wisconsin, June 10-15, p. 53.

[٦٢] Fischer, K. and Messner, K. (1992) Reducing troublesome pitch in pulp mills by lipolytic enzymes. *Tappi J.*, **75,** 130-134.

[٦٣] Mustranta, A., Fagernäs, L., and Viikari, L. (1995) Effects of lipases on birch extractives. *Tappi J.*, **78,** 140-146.

[٦٤] Mustranta, A., Spetz, P., Holmbom, B., and Buchert, J. (2001) Treatment of mechanical pulp and process waters with lipase. *J. Nordic Pulp Pap. Res.*, **2,** 125-129.

[٦٥] Blanco, A., Negro, C., Borch, K., Minning, S., Hannuksela, T., and Holmbom, B. (2005) Pitch control in thermomechanical pulping and papermaking by enzymatic treatments. *Appita J.*, **58,** 358-361.

[٦٦] Zhang, X. (2000) The effect of white-water dissolved and colloidal fractions on paper properties and effect of various enzyme treatments on the removal of organic components. *Pulp Pap. Can.*, **101,** 59-62.

[٦٧] Karlsson, S., Holmbom, S., Spetz, P., Mustranta, A., and Buchert, J. (2001) Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55,** 317-320.

[٦٨] Gutierrez, A., Del Rio, J., Ibarra, D., Rencoret, J., Romero, J., Speranza, M., Camarero, S., Martinez, M.J., and Martinez, A.T. (2006) Enzymatic removal of free and conjugated sterols forming pitch deposits in environmentally sound bleaching of eucalypt paper pulp. *Environ. Sci. Technol.*, **40,** 3416-3422.

[٦٩] Gutierrez, A., Del Rio, J., Rencoret, J., Ibarra, D., and Martinez, A.T. (2006) Main lipophilic extractives in different pulp types can be removed using the laccase-mediator system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **72,** 845-851.

[٧٠] Kantelinen, A., Hortling, B., Sundqvist, J., Linko, M., and Viikari, L. (1993) Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. *Holzforschung,* **47,** 318-324.

[٧١] Yang, J. and Eriksson, K.-E. (1992) Use of hemicellulolytic enzymes as one stage in bleaching of kraft pulps. *Holzforschung,* **46,** 481-488.

[٧٢] Buchert, J., Carlsson, G., Viikari, L., and Ström, G. (1996) Surface characterization of unbleached kraft pulps by enzymatic peeling and ESCA. *Holzforschung,* **50,** 69-74.

[٧٣] Vuorinen, T., Teleman, A., Fagerström, P., Buchert, J., and Tenkanen, M. (1996) Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps, paper presented at the International Pulp Bleaching Conference, Washington D.C., pp. 43-51.

[٧٤] Zhang, X., Nguyen, D., Jiang, Z.H., Audet, A., Paice, M., Renaud, S., and Tsang, A. (2007) Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: accessory enzymes degrade hexenuronic acids, paper presented at the 10th International Congress for Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Abstracts, Madison, Wisconsin, June 10-15, p. 28.

[٧٥] Suurn ä kki, A., Clark, T., Allison, R., Viikari, L., and Buchert, J. (1996) Xylanase-and mannanase-aided ECF and TCF bleaching. *Tappi J.,* **79,** 111-117.

[٧٦] Patel, R., Grabski, A., and Jeffries, T. (1993) Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **39,** 405-412.

[٧٧] Clarke, J., Rixon, J., Ciruela, A., and Gilbert, H. (1997) Family-10 and family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **48,** 177-183.

[٧٨] Rixon, J., Clarke, J., Hazlewood, G., Hoylamd, R., McCarthy, A., and Gilbert, H. (1996) Do the non-catalytic polysaccharide-binding domains and linker regions enhance the biobleaching properties of modular xylanases? *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 514-520.

[٧٩] Suurnäkki, A., Buchert, J., Niku-Paavola, M.I., Pere, L., and Viikari, L. (2006) Enzymes in pulp and paper processing. *In: Enzymes in Industry.* Aehle W. (Ed.). 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 232-244, 437-439.

[٨٠] Bourbonnais, R. and Paice, M. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2.2′-azinobis-(3-ethylbentzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **36,** 823.

[٨١] Call, H.P. (1995) Further improvements to the laccase-mediator system for enzymatic delignification and results from large-scale trials, Proceedings from the International Non-Chlorine Bleaching Conference, March 5-9, Florida, USA, Paper 4-3, 16.

[٨٢] Amann, M., Candussio, A., M ü ller, R., and Frey, V. (2000) *In situ* generation of mediator-a new concept for laccase-catalysed delignification of kraft pulp, paper presented at the *TAPPI Pulping Conference, Boston, USA, November 5-9.*

[٨٣] Amann, M. (1997) The lignozyme process coming closer to the mill. Proceedings from the International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, June 9-12, Montreal, F4, pp. 1-5.

[٨٤] Freudenreich, I., Amann, M., Fritz-Langhals, E., and Stohrer, J. (1998) Understanding the Lignozym®-process. Proceedings from the International Pulp Bleaching Conference, Helsinki, June 1-5, pp. 71-76.

[٨٥] Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., and Eriksson, K.-E.L. (1996) A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.,* **391,** 144-148.

[٨٦] Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, A.T., Romero, J., Gutierrez, A., and del Rio, J.C. (2006) Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb. Technol.,* **40,** 1264-1271.

[٨٧] Gutierrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., del Rio, J.C., and Martinez, A.T. (2007) Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin derived phenols as natural mediators. *Environ. Sci. Technol.,* **41** (11), 4124-4129.

[٨٨] Bourbonnais, R., Rochefort, D., Paice, M.G., Renaud, S., and Leech, D. (2000) Transition metal complexes: a new class of laccase mediators for pulp bleaching. *Tappi J.,* **83,** 68-79.

[٨٩] Gamelas, J., Pontes, A., Evtuguin, D., Xavier, R., and Esculcas, A. (2007) New polyoxometalate-laccase integrated system for kraft pulp delignification. *Biochem. Eng. J.,* **33** (2), 141-147.

[٩٠] Balakshin, M., Capanema, E., Chen, C.-L., Gratzl, J., Kirkman, A., and Gracz, H. (1999) Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system-reaction mechanisms for degradation of residual lignin. 10th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, Yokohama, Japan, vol. 1, pp. 572-577.

[٩١] Sealey, J. and Ragauskar, A. (1997) Fundamental investigations into the chemical mechanisms involved in laccase-mediator biobleaching. 9th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, Montreal, Canada, pp. F11-F14

[٩٢] Poppius-Levlin, K., Wang, W., Tamminen, T., Hortling, B., Viikari, L., and Niku-Paavola, M.-L. (1999) Effects of laccase/HBT treatment on pulp and lignin structures. *J. Pulp Pap. Sci.*, **25,** 90-94.

[٩٣] Chakar, F., and Ragauskas, A. (1999) The kismet of residual during LMS delignification of high-kappa kraft pulps. 10th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, Yokohama, Japan, vol. 1, pp. 566-570.

[٩٤] Poppius-Levlin, K., Wang, W., Ranua, M., Niku-Paavola, M.-L., and Viikari, L. (1997) Biobleaching of chemical pulps by laccase/mediator systems. Proceedings of the TAPPI/Biological Science Symposium, pp. 327-333.

[٩٥] Pfaller, R., Amann, M., and Freudenreich, J. (1998) Analysis of laccase and mediator interactions in the laccase mediator system. Proceedings of the 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Vancouver, Canada, pp. A99-A102.

[٩٦] Viikari, L., Oksanen, T., Buchert, J., Amann, M., and Candussio, A. (1999) Combined action of hemicellulases and oxidases in bleaching. Proceedings of the 10th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Yokohama, 7-10 June, vol. 1, pp. 504-507.

[٩٧] Oksanen, T., Suurn ä kki, A., Sch ö nberg, C., and Buchert, J. (1999) Effect of carbohydrates on the properties of reinforcement fi bers. Proceedings of the 10th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Yokohama, 7-10 June, vol. 1, pp. 440-445.

[٩٨] Freudenreich, I., Amann, M., Fritz-Langhals, E., and Stohrer, J. (1998) International Pulp Bleaching Conference, Helsinki, Finland, pp. 71-76.

[٩٩] Call, H.-P. (2003) Use of new enzymatic delignification and bleaching concepts for the treatment of high kappa pulps and for " cold cooking ", in *TAPPI Fall Technical Conference: Engineering, Pulping & PCE & I, Chicago, IL, United States, October 26-30,* TAPPI Press, Atlanta, GA, pp. 277-288.

[١٠٠] Call, H.-P. and Call, S. (2005) New generation of enzymatic delignification and bleaching Patent Assignee/ Corporate Source. *Pulp Pap. Can.*, **106** (1), 45-48.

[١٠١] Oksanen, T., Pere, J., Buchert, J., and Viikari, L. (1997) The effect of *Trichoderma reesei* cellulases and hemicellulases on the paper technical properties of never-dried bleached kraft pul. *Cellulose,* **4,** 329-339.

[١٠٢] Kantelinen, A., Sarkar, J., and Oksanen, T. (2000) Application of enzymes in production of release and high density papers. paper presented at the TAPPI Pulping Conference, Boston, USA, November 5-9, pp. 240-246.

[١٠٣] Thornton, J. (1994) Enzymaticdegradation of polygalacturonic acids released from mechanical pulp during peroxide bleaching. *Tappi J.*, **77,** 161-167.

[١٠٤] Thornton, J., Eckerman, C., Ekman, R., and Holmbom, B. (1996) Treatment of alkaline bleached mechanical wood pulp with pectinase, US Patent, 5,487,812.

[١٠٥] Reid, I. and Ricard, M. (2000) Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide, *Enzyme Microb Technol,* **26,** 115-123.

[١٠٦] Reid, I. and Ricard, M. (2000) Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enz. Microb. Technol.*, **26,** 115-123.

[١٠٧] Ricard, M., Orccotoma, J.-A., Ling, J., and Watson, R. (2005) Pectinase reduces cationic chemical costs in peroxide-bleached mechanical grades. *Pulp Pap. Can.*, **106,** 84-88.

[١٠٨] Ricard, M., Reid, I., and Orccotoma, J.-A. (2005) Pectinase reduces cationic chemical costs in peroxide-bleached TMP: a paper mill trial. *Pulp Pap. Can.*, **106,** 78-83.

[١٠٩] Paice, M., Reid, I., Bourbonnais, R., Archibald, F., and Jurasek, L. (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59,** 260-265.

[١١٠] Lobos, S., Larraondo, L., Salas, L., Karahanian, E., and Vicuna, R. (1998) Cloning and molecular analysis of a cDNA and the Cs-mnp1 gene encoding a manganese peroxidase isoenzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora. Gene,* **206,** 185-193.

[١١١] Prasad, D.Y., Heitman, J.A., and Joyce, T.W. (1993) Enzymatic deinking of colored offset newsprint. *Nordic Pulp Pap. Res. J.*, **2,** 284-286.

[١١٢] Jeffries, T.W., Klungness, J.H., Stykes, M.S., and Rutledge-Cropsey, K. (1994) Comparison of enzyme enhanced with conventional deinking of xerographic and laser printed waste papers. *Tappi J.*, **77,** 173-179.

[١١٣] Welt, T. and Dinus, R. (1995) Enzymatic deinking. *Prog. Pap. Recycling,* **4,** 36-47.

[١١٤] Morbak, A. and Zimmermann, W. (1998) Deinking of mixed office paper, old newspaper and vegetable oil based ink printed paper using cellulase, xylanases and lipases. *Prog. Pap. Recycling,* **7,** 14-21.

[١١٥] Zollner, H.K. and Schroeder, L.R. (1998) Enzymatic deinking of nonimpact printed white office paper with α-amylase. *Tappi J.*, **81,** 166-170.

[١١٦] Spiridon, I. and Machado de Andrade, A. (2005) Enzymatic deinking of old newspaper (ONP). *Prog. Pap. Recycling,* **14,** 14-18.

[١١٧] Patrick, K. (2004) Use of lipolytic enzymes for stickies control-enzyme technology improves efficiency, cost, and safety of stickies removal program. Paper Age, September 22-25.

[١١٨] Verhoef, R., Schols, H., Blanco, A., Siika-aho, M., Buchert, J., Lenon, G., and Voragen, A. (2005) Sugar composition and FT-IR analysis of exopolysaccharides produced by microbial isolates from paper mill slime deposits. *Biotechnol. Bioeng.*, **91,** 91-105.

[١١٩] Dykstra, G. and Stoner, M. (1997) Enzymes and biodispersants. Proceedings of the TAPPI/Biological Science Symposium, 117-124.

[١٢٠] Van Haute, E. (1999) Biodispersant and enzyme treatments. A new approach to deposit control, paper presented at the Proceedings of the 53rd Appita Annual Conference, Rotorua, New Zealand, vol. 2, pp. 575-579.

[١٢١] Covarrubias, R. and Jones, D. (2005) Optimyze-Enzymatic stickies control developments, paper presented at the Annual Meeting of the Pulp and Paper Technical Association of Canada (PAPTAC), A107-A110.

[١٢٢] Nilvebrant, N., Reimann, A., de Sousa, F., Cassland, P., Larsson, S., Hong, F., and Jönsson, L.J. (2002) Enzymatic degradation of oxalic acid for prevention of scaling. *Prog. Biotechnol.*, **21,** 231-238.

[١٢٣] Grönqvist, S., Rantanen, K., Alen, R., Mattinen, M.-L., Buchert, J., and Viikari, L. (2006) Laccase-catalysed functionalisation of TMP with tyramine. *Holzforschung,* **60,** 503-508.

[١٢٤] Chandra, R. and Ragauskas, A. (2002) Evaluating laccase-catalysed coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. *Enzyme Microb. Technol.*, **30,** 855-861.

[١٢٥] Chandra, R., Lehtonen, L., and Ragauskas, A. (2004) Modification of high lignin content kraft pulps with laccase to improve paper strength properties. 1. Laccase treatment in the presence of gallic acid. *Biotechnol. Prog.*, **20,** 255-261.

[١٢٦] Chandra, R., Felby, C., and Ragauskas, A. (2004) Improving laccase-facilitated grafting of 4-hydroxybenzoic acid to high-kappa pulps. *J. Wood Chem. Technol.*, **24,** 69-81.

[١٢٧] Thurston, C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases.*Microbiol.*, **140,** 19-26.

[١٢٨] Gianfreda, L., Xu, F., and Bollag, J.M. (1999) Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed. J.*, **31,** 1-25.

[١٢٩] Felby, C., Pedersen, L.S., and Nielsen, B.R. (1997) Enhanced auto adhesion of wood fibres using phenol oxidases. *Holzforschung*, **51,** 281-286.

[١٣٠] Felby, C., Nielsen, B.R., Olesen, P., and Skibsted, L.H. (1997) Identification and quantification of radical reaction intermediates by electron spin resonance spectrometry of laccase-catalysed oxidation of wood fi bres from beech (*Fagus sylvatica)*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48,** 459-464.

[١٣١] Felby, C., Hassinboe, J., and Lund, M. (2002) Pilot-scale production of fibreboards made by laccase oxidized wood fibres: board properties and evidence for crosslinking of lignin. *Enzyme Microb. Technol.*, **31,** 736-741.

[١٣٢] Huttermann, A., Mai, C., and Kharazipour, A. (2001) Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55,** 387-395.

[١٣٣] Brumer, H., Qi, T., Baumann, M., Carlsson, K., and Teeri, T. (2004) Activation of crystalline cellulose surfaces through the chemoenzymatic modification of xyloglucan. *J. Am.Chem. Soc.*, **126,** 5715-5521.

[١٣٤] Teeri, T., Brumer, H., Daniel, G., and Gatenholm, P. (2007) Biomimetic engineering of cellulose-based materials. *Trends Biotechnol.*, **25** (7), 299-306.

[١٣٥] Gustavsson, M.T., Persson, P.V., Iversen, T., Martinelle, M., Hult, K., Teeri, T., and Brumer, H., III (2005) Modification of cellulose fiber surfaces by use of a lipase and a xyloglucan endotransglycosylase. *Biomacro-molecules*, **6** (1), 196-203.

الفصل الثاني عشر

الوقود الحيوي: الإنتاج والتطبيقات
BIOFUELS: PRODUCTION AND APPLICATIONS

أليكساندري روجي وفريدريك مونوت

Alexandre Rojey and Frédéric Monot

(١٢,١) تجدد الاهتمام في الوقود الحيوي A Renewed Interest in Biofuels

ينتفع الوقود الحيوي حالياً من تجدد الاهتمام في جميع أنحاء العالم. وهو يعدُّ خياراً واعداً للحد من اعتماد الدول المستهلكة للطاقة على واردات النفط. ويمكن في الوقت نفسه أن يساعد على كبح انبعاثات ثاني أكسيد الكربون ويقدم بذلك إجابة للتحدي المتمثل في تغير المناخ العالمي.

وكان الدافع أيضاً لتطوير الوقود الحيوي هو التجربة الإيجابية لاستخدامه الواسع في البرازيل، والولايات المتحدة، وإلى حدٍ أقل في أوروبا. ويجعل ارتفاع أسعار النفط الخام أيضاً الوقود الحيوي أكثر قدرة على المنافسة.

لذلك، يتم وضع أهداف تنموية طموحة في معظم البلدان الصناعية. وتخطط الولايات المتحدة والاتحاد الأوروبي لتحقيق إنتاج للوقود الحيوي من مستوى هامشي حوالي ١٪ من وقود المحركات إلى إختراقٍ هام في سوق وقود المحركات، فوق ١٠٪.

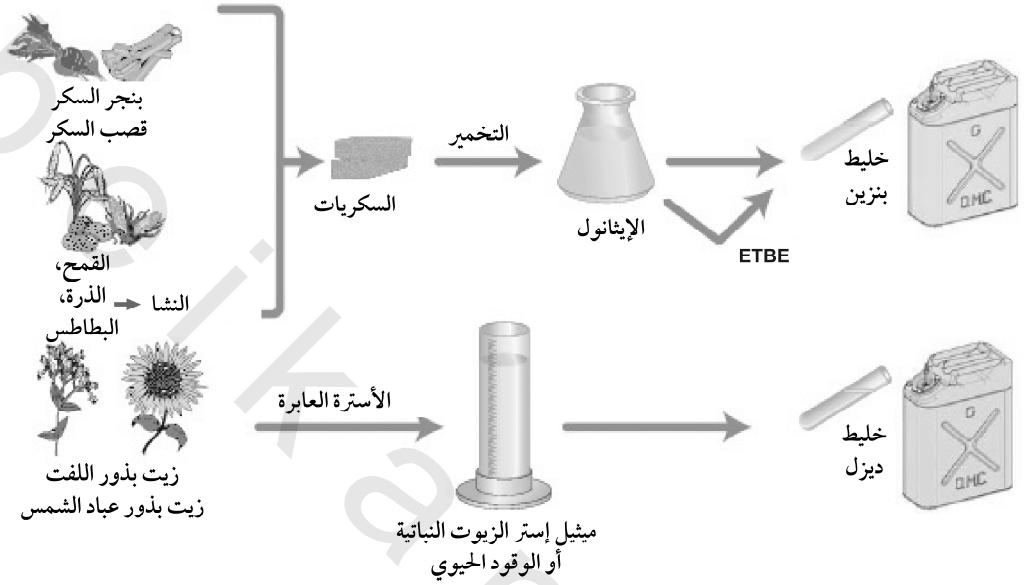
والسؤال الذي يطرح نفسه هو معرفة مدى توفر موارد الكتلة الحيوية الكافية وعما إذا كانت التقنية مستعدة لمثل هذا التقدم. وعلاوةً على ذلك، هل من الممكن ضمان استدامة مستويات الإنتاج هذه؟

هذه هي الأسئلة الرئيسة التي أخذت في الاعتبار في هذا الفصل.

(١٢,٢) مسارات التحويل الحالية Present Conversion Pathways

يستخدم في الوقت الحاضر نوعين رئيسين من الوقود الحيوي: الإيثانول، في محركات الإشعال بالشرارة وإسترات ميثيل الزيوت النباتية (VOME) في محركات الديزل. يتم صنع الإيثانول حالياً من نوعين من

المحاصيل (الشكل رقم ١٢,١): النباتات الـمنتجة للسكر (قصب السكر، وبنجر السكر) والنباتات النشوية الـمنتجة للنشا (القمح والذرة). يتم الحصول على الجلوكوز من تـحليل النشا فـي وجـود الإنزيمات (الأميليز والأميلوجلوكوسيديز).



الشكل رقم (١٢,١). مسارات التحويل الحالية.

ويتم إنتاج الإيثانول من السكر عن طريق التخمير. ويمكن استخدامه بصورةٍ نقية، أو مخلوطاً مع وقود السيارات، أو في شكل الأثير له، ETBE المنتج من التفاعل مع أيزوبيوتان المصفاة أو البتروكيماويات. وعلى الرغم من أنه يمكن مزج الإيثانول مع البنزين عند تركيزات منخفضة، بين ٥ و١٠٪، ويستخدم في محرك دون تعديلات كبرى، إلا أنه يمكن أن تنشأ بعض الصعوبات؛ نتيجة لضغط بخاره العالي نسبياً والميل إلى عدم الامتزاج في وجود الماء. لذلك يتم في أوروبا استخدام الإيثانول أساساً على صورة ETBE من أجل تجنب هذه العيوب.

ويمكن أيضاً أن يستخدم الإيثانول في تركيزات عالية (عادةً ٨٥٪، في بنزين E85) في المحركات المعدلة خصيصاً. ويمكن حتى استخدام كلٍ من E85 والبنزين القياسي أو مزيج من هذين النوعين من الوقود في أي نسبة، في المركبات ثنائية الوقود (FFV). يتم في مثل هذه المركبة ضبط المحرك تلقائياً وفقاً لتكوين الوقود المستخدم.

والإيثانول هو الوقود الحيوي الأكثر استخداماً في الوقت الحاضر. وبلغ الإنتاج العالمي من الإيثانول كوقود للسيارات ٢٧ مليون طن (مكافئ لـ ١٨ مليون طن من البترول) في عام ٢٠٠٥م، أي تقريباً ضعف المستوى في عام ٢٠٠٠م. ويتركز الإنتاج في البرازيل والولايات المتحدة. في عام ٢٠٠٥م، أنتجت أوروبا حوالي ٧٥٠٠٠٠

طن من الإيثانول كوقود للسيارات واستوردت ٢٠٠٠٠٠ طن لتغطية الاستهلاك. ويتم الجزء الأكبر من الإنتاج في أسبانيا، والسويد، وألمانيا، وفرنسا [١].

في أوروبا؛ بسبب ارتفاع حصة محركات الديزل، فإنه يتم تفضيل وقود الديزل الحيوي المنتج بواسطة الأسترة الناقلة للزيوت النباتية، ولا يزال إجمالي إنتاج وقود الديزل الحيوي في جميع أنحاء العالم منخفضاً بالمقارنة مع الإيثانول، والبالغ نحو ٤ ملايين طن مكافئ للبترول في عام ٢٠٠٥م. ويتم إنتاج ما يقرب من ٩٠٪ في أوروبا.

بلغ الوقود الحيوي السائل في دول الاتحاد الأوروبي الـ ٢٥ ما يقرب من ٢٠٤٠ كيلوطن مكافئ في عام ٢٠٠٤م أو حوالي ٠,٧٪ من السوق. ووقود الديزل الحيوي من بذور اللفت هو الغالب، مع إنتاج ما يقرب من ٢ مليون طن في عام ٢٠٠٤م، لا سيما في ألمانيا وفرنسا وإيطاليا.

ويتم حالياً إنتاج أنواع أخرى من وقود النقل في أحجام سوق منخفضة، على سبيل المثال الغاز الحيوي في السويد أو الزيت النباتي النقي في ألمانيا.

على الرغم من أن مستويات الإنتاج مهمة بالفعل، لا يزال الوقود الحيوي يمثل حصة صغيرة، أعلى قليلاً من ١٪ من إجمالي الطاقة المستهلكة للنقل البري. وإذا كان من المتوقع أن يساهم الوقود الحيوي بصورة أكبر، فيجب أن يتحرك من مكان مادة مضافة (نسبة ضئيلة) إلى جزء مزج كبير من استهلاك وقود النقل البري (أكثر من ١٠٪).

ومن الناحية الاقتصادية وبسبب الزيادات الأخيرة في أسعار النفط، بدأ الوقود الحيوي يصبح أكثر قدرة على المنافسة، ولكن لا يزال بحاجة إلى الدعم الشعبي كما هو موضح في الجدول رقم (١,١٢). والإيثانول المنتج من قصب السكر في البرازيل هو الوقود الحيوي الأكثر قدرة على المنافسة، بتكلفة قريبة جداً من البنزين. وإذا زاد سعر النفط مستقبلاً كما هو متوقع عموماً، فقد يصبح الوقود الحيوي قادراً على المنافسة بصورةٍ مباشرة على أساس اقتصادي بحت.

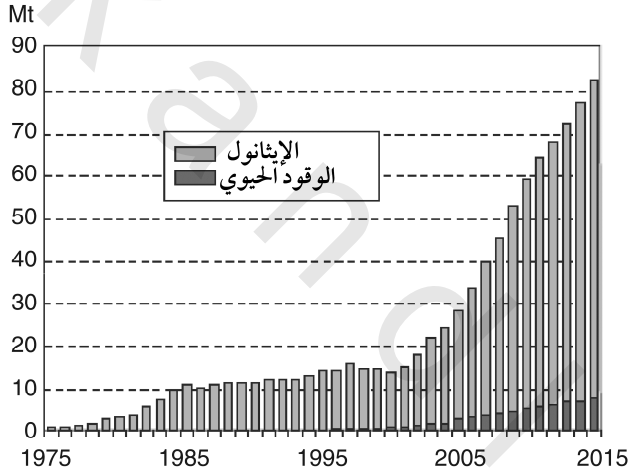
الجدول رقم (١,١٢). تكلفة إنتاج الوقود الحيوي مقارنةً بوقود الجازولين والديزل المشتق من البترول.

	الإيثانول أوروبا	الإيثانول البرازيل	الإيثانول الولايات المتحدة الأمريكية	VOME أوروبا	الجازولين ٦٠ دولار أمريكي/ برميل	الديزل ٦٠ دولار أمريكي/ برميل
يورو/ لتر	٠,٤-٠,٦	٠,٢	٠,٣	٠,٣٥-٠,٦٥	٠,٣٢	٠,٣٦
يورو/ جالون	١٩-٢٩	١٠	١٤	١٠,٥-٢٠	٩	١٠

VOME ميثيل الأستر للزيوت النباتية.

من بيانات IFP/IEA ديسمبر ٢٠٠٦م [١].

ومن المتوقع أن تحدث زيادة سريعة في إنتاج الوقود الحيوي في السنوات المقبلة كما هو مبين في الشكل رقم (١٢,٢). والهدف في الولايات المتحدة هو الوصول إلى حصة ٤٪ بحلول عام ٢٠١٠م و٢٠٪ بحلول عام ٢٠٣٠م. وقد حدد الاتحاد الأوروبي هدفاً أولياً بحوالي ٥,٧٥٪ لحصة الوقود الحيوي بحلول عام ٢٠١٠م. ومن المتوقع أن تزيد حصة الوقود الحيوي في المستقبل، كما ينعكس في رؤية المجلس الاستشاري لبحوث الوقود الحيوي (Biofrac)، الذي يستهدف معدل استبدال ٢٥٪ بحلول عام ٢٠٣٠م [٢]. ومن أجل دعم مثل هذا التطور، قرر الاتحاد الأوروبي تنفيذ إستراتيجية إقليمية طموحة مصممة للتشجيع المتواصل لتنمية وإنتاج الوقود الحيوي. ويذكر قرار المجلس المتخذ في ٨-٩ مارس، ٢٠٠٧م فيما يتعلق بالإستراتيجية طويلة المدى لتطوير مصادر الطاقة المتجددة (RES) في الاتحاد الأوروبي، أن من بين الأهداف الـ ٢٠٪ المتفق عليها من للـ RES بحلول عام ٢٠٢٠م، ينبغي أن تستمد ١٠٪ من الوقود الحيوي.



الشكل رقم (١٢,٢). اتجاهات إنتاج الوقود الحيوي في العالم. من إف أو لايت، كريستوف بيرج، الوقود الحيوي العالمي، إشبيلية، ٢٠٠٦م [٢].

(١٢,٣) إنتاج وقود الديزل الحيوي من الزيوت والدهون النباتية

Biodiesel Production from Vegetable Oils and Fats

(١٢,٣,١) عمليات الأسترة Esterification Processes

يتم إنتاج وقود الديزل الحيوي في الوقت الحاضر من محاصيل البذور الزيتية (بذور اللفت، وعباد الشمس، وفول الصويا)، التي يتم تحويلها إلى إسترات الميثيل (إسترات ميثيل الأحماض الدهنية أو FAME).

وقد أخذ الاستخدام المباشر للزيوت النباتية كوقود ديزل حيوي في الاعتبار في الماضي وأحياناً لا يزال حالياً. ومع ذلك، فإن فخصائص الزيوت النباتية غير مناسبة تماماً لمثل هذا الاستخدام المباشر، كونها ثقيلة للغاية،

ولزجة جداً وغير مستقرة بما فيه الكفاية. وعندما تستخدم في محركات الاحتراق الداخلي فهي تؤدي إلى ترسيبات، وإلى ضعف الأداء وربما أيضاً الأعطال الميكانيكية [٣].

وتكون الزيوت النباتية في الغالب إسترات ثلاثية الأسيل للجلسرين (الدهون الثلاثية). عن طريق التفاعل مع الميثانول خلال أسترة ناقلة، ويتم تحويلها إلى أسترات ميثيل وجلسرين. وأسترات الميثيل لها الخصائص المطلوبة للاستخدام في محركات الديزل.

من المتوقع أن تستخدم عمليات وقود الديزل الحيوي في المستقبل مجموعة واسعة من مواد النفط الأولية المتجددة. وسوف يكتسب زيت النخيل والمواد الأولية غير الغذائية عالية العائد المتجددة التي لم تستكشف بشكلٍ جيد حتى الآن، مثل الجاتروفا، والأنواع المختلفة من الطحالب، وكذلك المزيد من مجاري النفايات الصناعية التي تحتوي على الدهون الثلاثية حصصاً في السوق.

في الوقت الحاضر، تعتمد التقنية الأكثر استخداماً لإنتاج وقود الديزل الحيوي على التحفيز المتجانس. وتستخدم محفزات مختلفة: قاعدية (على سبيل المثال، الهيدروكسيدات، والأمينات) أو الحمضية (مثل المعادن، والسلفونيك، والزيولايت، والراتنجات)، وألكولات التيتانيوم، أو أكاسيد المعادن، ويمكن أن تكون العمليات دفعة واحدة أو مستمرة. والعمليات المستمرة هي الأنسب لمحطات العمليات ذات السعة الكبيرة، أكثر من ١٠٠٠٠٠ طن في السنة.

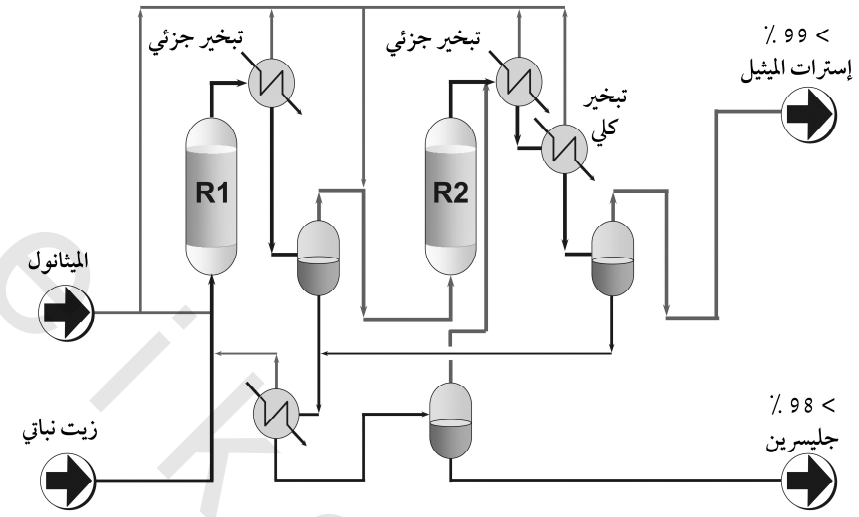
يتم إدخال الزيوت النباتية، والميثانول بتركيز زائد، والمحلول المحفز في المفاعلات بتسلسل عند ضغط منخفض (<٣ بار) وعند درجة حرارة معتدلة (٤٥–٩٠ درجة مئوية). وتتراوح درجة نقاء الجلسرين المنتج ثانوياً بين ٨٠–٩٠٪. وهذا يعني أنه يتطلب المزيد من التنقية لمعظم التطبيقات في الصناعة الكيميائية.

وقد تم تطوير تقنية جديدة تدعى عملية Esterfip-H، والتي تستخدم محفز غير متجانس من ألومينات الزنك بواسطة IFP [٣]، ويجري تسويقها بواسطة شركة آكسنس. وتحقق هذه العملية التي تعمل على أساسٍ مستمر عائداً عالياً وجلسرين عالي النقاوة، مما يجعلها مناسبةً للكثير من التطبيقات في الصناعة الكيميائية. ويظهر مخطط سير العملية في الشكل رقم (٣, ١٢). وتعمل اثنتان من المنشآت الصناعية، واحدة في فرنسا وواحدة في السويد، وستة آخرين تحت الإنشاء، مع قدرة تراكمية ٣ ,١ مليون طن سنوياً.

وهناك تطورات جديدة جارية لإنتاج إسترات الإيثيل (إسترات إيثيل الأحماض الدهنية أو FAEE) باستخدام عملية أسترة ناقلة في وجود الإيثانول بدلاً من الميثانول. والميزة هي أنه يمكن إنتاج الـ FAEE ن الكتلة الحيوية فقط، في حين أنه في عملية الـ FAME، يتم إنتاج الميثانول عادةً من الغاز الطبيعي.

ويكون تحويل الزيوت النباتية إلى FAEE أكثر صعوبة من التحويل إلى FAME. ويكون صعباً على وجه الخصوص في حالة العملية التي تستخدم عامل محفز متجانس؛ لأنه في وجود المحفز والجلسرين يميل التفاعل

العكسي إلى الحدوث أثناء عملية التقطير. ويجعل هذا استخدام المحفزات غير المتجانسة يبدو واعداً. وهذه التقنية قيد التطوير ولكن ليست بعد متاحة تجارياً.



الشكل رقم (١٢,٣). عملية التحفيز غير المتجانسة لإنتاج أستر ميثيل الأحماض الدهنية.

(١٢,٣,٢) خصائص إسترات الزيوت النباتية Properties of Vegetable Oil Esters

يقارن الجدول رقم (١٢,٢) بين الخصائص الرئيسة لوقود الديزل القياسي المستمد من النفط، وزيت نباتي نقي، والـ FAME المنتج من زيت بذور اللفت. ويدل هذا على أن الـ FAME له خصائص مشابهة لتلك التي لزيت الغاز، من حيث الوزن النوعي، واللزوجة، ومعامل السيتان، وليس هذا هو الوضع في حالة زيت بذور اللفت. ويجب أن تتوافق أسترات الزيوت النباتية التي تستخدم كوقود حيوي مع بعض الخصائص. ويتم تعريفها في الاتحاد الأوروبي بالمبدأ CEN 14 214، ولكن كل بلد له خصائصه الخاصة التي تحدد مجموعة من الصفات (الوزن النوعي، واللزوجة)، والحد الأقصى لمستوى الشوائب، والثبات تجاه الأكسدة. ويمكن استخدام المنتجات التي تمتثل لهذه الخصائص فقط بأمان في محركات الاحتراق الداخلي.

الجدول رقم (١٢,٢). الخصائص الرئيسة لزيت الغاز، زيت بذور اللفت، وميثيل إستر الأحماض الدهنية (FAME).

الخصائص	زيت الغاز	زيت بذور اللفت	FAME
الوزن النوعي (كجم/ م٣)	٨٢٠-٨٦٠	٩٢٠	٨٨٠-٨٨٥
اللزوجة عند ٤٠° (مم٢/ ث)	٢-٤,٥	٣٠,٢	٤,٥
معامل السيتان	<٤٩	٣٥	٥٠
درجة الوميض (د°)	≤١٠٠	تتحلل أعلى من ٣٢٠°	١٧٠-١٨٠

تختلف خصائص أسترات الزيوت النباتية وفقاً للزيت النباتي المستخدم. تحتوي الإسترات المشتقة من زيوت فول الصويا وعباد الشمس على مستويات عالية نسبياً من الجزيئات غير المشبعة (التي تتميز بمؤشر يود عالي)، وفي الاتحاد الأوروبي يجب أن يتم خلطها مع إسترات ميثيل زيت بذور اللفت. والإسترات المشتقة من زيت النخيل لها نقطة سكب عالية ولا يمكن استخدامها بشكلٍ مباشر في السوق الأوروبية. ويمكن تحسين هذه الخصائص عن طريق البلورة و الترشيح.

(١٢,٣,٣) عمليات الهدرجة Hydrogenation Processes

تتم الطريقة الأخرى لتحويل الدهون الثلاثية الموجودة في الزيوت النباتية من خلال الهدرجة. وتجعل معالجة الهدرجة الحفزية للزيوت النباتية عند ٣٠٠ درجة مئوية من الممكن الحصول على خليط من إن-بارافينات، والبروبان، والماء. ويمكن القضاء على جميع المكونات غير المشبعة وعليه يمكن الحصول على وقود ديزل حيوي عالي الجودة من مجموعة واسعة من المواد الخام، بما في ذلك الدهون الحيوانية. ولا يتم إنتاج الجلسرين، مما يعني أنه لا توجد حاجة لمنفذ خاص للجلسرين كمنتج ثانوي، ولكن تكون قيمة البروبان منخفضة نسبياً.

وتتطلب هذه العملية الهيدروجين (حوالي ٣,٦٪ من وزن المواد الأولية، في حالة زيت بذور اللفت)، مما يعني أن ذلك هو الأنسب للوحدات التي تعمل المصافي. وعليه، فمن الممكن دراسة إما عملية تشغيل ثانوية لتحويل مخاليط من المنتجات المشتقة من النفط والكتلة الحيوية أو وحدات مخصصة لتحويل منتجات الكتلة الحيوية.

وقد حدثت تطويرات واسعة النطاق بواسطة شركة فورتشوم ونستي للنفط في فنلندا. وحيث إن جودة المنتجات التي تم تحقيقها هي مشابهة جداً لتلك التي يتم الحصول عليها في عملية فيشر-تروبش، فقد أطلق على العملية التي طورتها نستي للنفط NextBtL، وذلك كمرجع لعملية BtL الموضحة لاحقاً في هذا الفصل. ومع ذلك تختلف عملية التحويل الأساسية تماماً [٨].

ولا ينتج هذا المسار فقط وقود ديزل ذو جودة عالية جداً، ولكن يسمح أيضاً ببعض المرونة في اختيار المواد الأولية (النخيل، وزيت فول الصويا، وحتى الدهون الحيوانية). ويزيد استهلاك الهيدروجين من تكلفة الإنتاج، وبالتالي فإن التقنية تكون هي الأنسب لتحويل الزيوت والدهون المشبعة، مثل زيوت النخيل وجوز الهند، وكذلك الدهون الحيوانية. ويتم حالياً تشييد عدة مصانع في أوروبا بهدف إنتاج حوالي ٢٠٠٠٠٠ طن من الوقود الحيوي سنوياً.

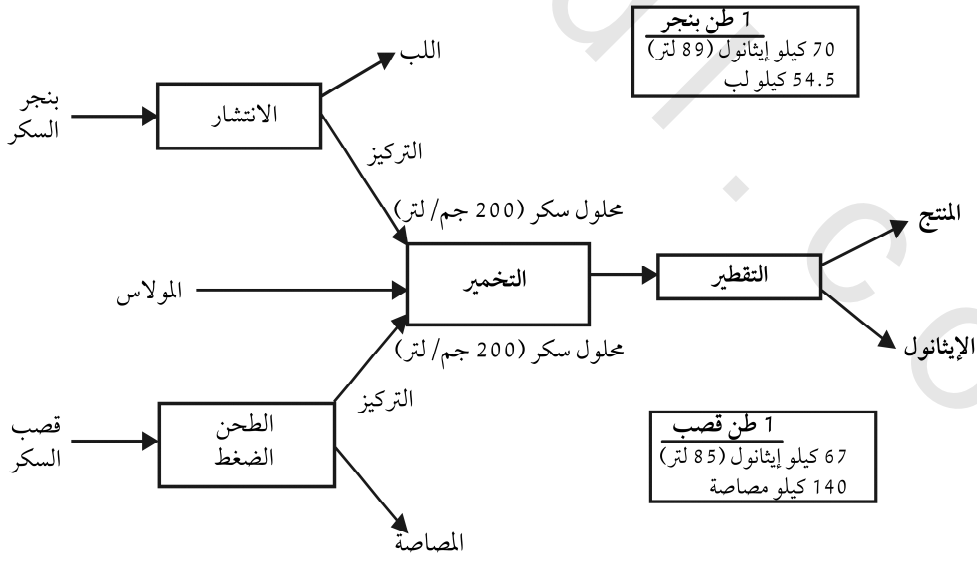
(٤ , ١٢) إنتاج الإيثانول والـ Ethanol and ETBE Production (ETBE)

(١ , ٤ , ١٢) إنتاج الإيثانول من السكر والنشا Ethanol Production from Sugar and Starch

تكون الخطوة الأولى عند البدء من نباتات السكر أو النباتات النشوية هي استخلاص السكر (الشكل رقم ٤ , ١٢). في حالة قصب السكر، يتم ذلك عن طريق الطحن والضغط من أجل فصل محلول السكر من تفل قصب السكر، والذي هو جزء الحصاد اللجنوسليولوزي من النبات. ويمكن استخدام تفل قصب السكر كوقود، مما يساعد على تحسين ميزان الطاقة والكربون. وفي حالة بنجر السكر، يتم استخلاص السكر بالماء الساخن من خلال عملية الانتشار. ويستخدم اللب المفصول لتغذية الحيوانات في حين يمكن ارسال السكر المستخلص، السكروز، مباشرةً إلى خطوة التخمير.

ويجب تحليل النشا المفصول من الحبوب من أجل الحصول على الجلوكوز. وكان ذلك يتم في الماضي في وجود حامض الهيدروكلوريك، لكن في الوقت الحاضر يتم ذلك في وجود الإنزيمات، مما يزيد من عائد الجلوكوز و يحسن الاقتصاديات (وخاصة في عملية الطحن الجاف). وخلال خطوة أولية، تتم إسالة معلق النشا عند ١٠٥ درجة مئوية في وجود الألفا-أميليز. ويتم إنتاج الجلوكوز خلال الخطوة الثانية عند ٦٠ درجة مئوية ودرجة حموضة حوالي ٥ باستخدام إنزيم ثاني، الجلوكوأميليز.

بعد التركيز، يتم إرسال محلول السكر إلى قسم التخمير. والتفاعل الستويكيومتري الأساسي هو التالي:



الشكل رقم (٤ , ١٢). إنتاج الإيثانول من نباتات السكر.

كان تحويل السكريات إلى الإيثانول يتم عن طريق التخمير من سنواتٍ عديدة. ويمكن استخدام كائنات حية دقيقة كثيرة، الخمائر والبكتيريا. وتعد الخمائر من جنس السكاروميسيس (خاصةً سكاروميسيس سيرفيسي) هي الأكثر مناسبةً لتحقيق عائد مرتفع. فهي متينة ومستقرة جداً في الظروف الصناعية غير المعقمة. ومن بين البكتيريا، يتم تكييف الزيموموناس موبيليس بصورةٍ جيدة، ولكنها تظهر أيضاً بعض العيوب، مثل الحاجة إلى استخدام ظروف معقمة للتخمير وصعوبة فصلها؛ وذلك بسبب صغر حجمها.

ويتم الآن إجراء خطوة التخمر في كثيرٍ من الأحيان بطريقة مستمرة، في سلسلة من مفاعلات التقليب. ويمكن استرداد الخمائر من خلال خطوة ترشيح أو طرد مركزي، وإعادة تدويرها على الأقل جزئياً، على الرغم من أن الخمائر الجافة أو المعلقات المركزة تكون بديلاً ذا اهتمامٍ متزايد.

يكون تركيز الإيثانول عند الخروج من السلسلة بشكلٍ عام أعلى من ١٠٪ حجم/ حجم. ويمكن أن تصل عائدات التحويل إلى نحو ٩٢٪ من العائد النظري. وتكون عملية التخمير طاردة للحرارة وتنتج ١,٢ مول جول/ كجم من الإيثانول الناتج.

(١٢,٤,٢) إنتاج الـ ETBE Production (ETBE)

في أوروبا، يتم استخدام الإيثانول على نطاقٍ واسع في شكل مشتقات، إثير البيوتيل رباعي الإيثيل (ETBE). يتم إنتاج الـ ETBE عن طريق تفاعل الأيزوبيوتين مع الإيثانول ويستخدم لتجنب بعض السلبيات التي سبق ذكرها فيما يتعلق باستخدام الإيثانول في تجمع البنزين.

يكون التفاعل عكسياً وطارد للحرارة. ويتم إجراؤه عند درجة حرارة منخفضة نسبياً (أقل من ١٠٠ درجة مئوية)، في وجود راتنج تبادل أيوني مثل راتنج بوليسترين السلفونيك المتشابك حمضياً، ووجود فائض من الإيثانول من أجل تحسين عائد التحويل.

عند مغادرة منطقة التفاعل، يتم فصل الـ ETBE عن طريق التقطير. ويتم استرداد الـ ETBE في الجزء السفلي من العمود. وفي الجزء العلوي من العمود يتم فصل الإيثانول جنباً إلى جنبٍ مع الهيدروكربونات الخفيفة الذي يشكل معها مخلوطات أزيوتروبية (Azeotropes).

ويمكن تحسين هذا التصميم باستخدام عمود تحفيز. يتم وضع المحفز في المقطع العلوي من عمود التقطير من أجل زيادة عائد التحويل. وتتوفر تقنيات مختلفة من شركات CdTech، UOP، وIFP/ آكسنس.

(١٢,٤,٣) خصائص الإيثانول والـ ETBE (Properties of Ethanol and ETBE (ETBE

يلخص الجدول رقم (١٢,٣) الخصائص الرئيسة للإيثانول والـ ETBE. الإيثانول له رقم اوكتان كبير نسبياً وكثافة قريبة من كثافة البنزين. وكما سبق ذكره، تتمثل العيوب الرئيسة في امتزاجه العالي مع المياه الذي يمكن أن يؤدي إلى فصل المراحل، وحرارة التبخر الكامنة العالية التي يمكن أن تجعل بدء المحرك أكثر صعوبة في فصل الشتاء. وتكون خصائص الـ ETBE أقرب لتلك التي تكون للبنزين القياسي، ويمكن إدراجها بسهولة في تجمع البنزين.

الجدول رقم (١٢,٣). الصفات الرئيسة للإيثانول، وإثير البيوتيل رباعي الإيثيل (ETBE).

	الإيثانول	ETBE	الجازولين (المقياس)
الكثافة (جم/ مول)	٤٦,٠٧	١٠٢	١٠٢,٥
الكتلة الحجمية (كجم/ م^{٣})	٧٩٤	٧٥٠	٧٣٥-٧٦٠
حرارة التبخر الكامنة (كيلوجول/ كجم)	٨٥٤	٣٢١	٢٨٩
درجة الغليان (درجة مئوية)	٧٨,٤	٧٢,٨	٣٠-١٩٠
قيمة التسخين الصغرى (كيلوجول/ كجم)	٢٦٨٠٥	٣٥٨٨٠	٤٢٦٩٠
RON	١١١	١١٧	٩٥
MON	٩٢	١٠١	٨٥

RON، رقم أوكتان البحث؛ MON، رقم أوكتان الموتور.

(١٢,٥) الحاجة للتطويرات الجديدة The Need for New Developments

تثير الزيادة الكبيرة المخططة لتغلغل الوقود الحيوي بعض القضايا الصعبة. القضية الأولى هي توافر الأرض اللازمة لإنتاج الكتلة الحيوية المطلوبة والمنافسة مع الطعام. في الاتحاد الأوروبي، يقتضي الوصول إلى هدف الـ ٥,٧٥٪ لعام ٢٠١٠م إلى إنتاج ١٦,٦ مليون طن من الوقود الحيوي (مكافئ لـ ٥,٦ مليون طن من الإيثانول و١١ مليون طن من الديزل الحيوي). وسوف يتطلب تحقيق هذا المخرج حوالي ٨٢ مليون طن من الكتلة الحيوية ومساحة أرض ١٣,٨ مليون هكتار تقريباً. ويجب مقارنة ذلك مع مساحة الأرض الصالحة للزراعة، والتي تبلغ ١١٥ مليون هكتار، يترك منها ٨,٣ مليون هكتار أرضاً بور. تبين هذه الأرقام أنه بالفعل في عام ٢٠١٠م لن تكون مساحة الأراضي البور كبيرة بما يكفي لإنتاج الكميات اللازمة من الوقود الحيوي وأنه سوف ينشأ تنافس مع تطبيقات المواد الغذائية إذا تم إنتاج كميات الوقود الحيوي هذه في أوروبا. وبالنظر أبعد من ذلك، فسوف يتطلب إحلال ١٠٪ من البنزين والديزل المنتج في الاتحاد الأوروبي والولايات المتحدة استخدام حوالي ٤٠٪ من الأراضي

الصالحة للزراعة في هذه المناطق [٥]. وإذا تجاوز تغلغل الوقود الحيوي ١٠٪، فإنه من الواضح أنه لابد من البحث عن مصادر جديدة للكتلة الحيوية.

ويصبح الوضع مختلفاً جداً إذا كان من الممكن استخدام الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية لإنتاج الوقود الحيوي. في مثل هذه الحالة، يصبح الكثير من الكتلة الحيوية متوفراً. وتمت مناقشة هذه القضية في القسم (٦, ١٢).

والقضية الثانية هي استدامة العمليات التي يتم النظر فيها. يجب أخذ المعايير المختلفة للاستدامة في الاعتبار. المعيار الأول هو ميزان ثاني أكسيد الكربون بناءً على أساس دورة الحياة، من إنتاج الكتلة الحيوية إلى الاستخدام النهائي للوقود الحيوي في محركات الاحتراق الداخلي. إذا تم استخدام الوقود الحفري لتزويد الطاقة لعملية التحويل، فإن المكاسب الإجمالية قد تكون صغيرة أو حتى سلبية في بعض الحالات. ولذلك يكون التقييم الصحيح للمكاسب الإجمالية في انبعاثات ثاني أكسيد الكربون مهماً جداً. ويجب أيضاً إدراج مساهمة غازات الاحتباس الحراري الأخرى، مثل بروتوكسيد النيتروجين (N_2O)؛ نتيجة استخدام أسمدة النترات، في الميزان.

ويجب أيضاً أن تؤخذ قضايا مهمة أخرى في الاعتبار، وخاصةً فيما يتعلق بإنتاج الكتلة الحيوية. فمن المهم أن لا يؤدي إنتاج الكتلة الحيوية إلى الإزالة الضخمة للغابات أو فقدان مغذيات التربة. وقد نوقشت مسألة الاستدامة هذه في القسم (٩, ١٢).

هذا يعني أن هناك حاجة لعملياتٍ جديدة لتطوير عمليات الجيل الثاني، والتي يمكن أن تستخدم الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية كمادة أولية وتساعد على تحسين استدامة خيار الوقود الحيوي.

(٦, ١٢) مصادر الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية Lignocellulosic Biomass Resources

يجعل تحويل الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية من الممكن حشد كميات كبيرة من القش والخشب التي لا تستغل حالياً في الحصول على الطاقة. في أوروبا، يمكن استخدام ٤١,٣ مليون طن من قش الحبوب وقش البذور الزيتية وكذلك ١٦٤ مليون طن من الخشب لإنتاج حوالي ٣٣ مليون طن مكافئ من الوقود الحيوي سنوياً. ويكون مجموع كمية مخلفات المحاصيل (بما في ذلك الحبوب، والبذور الزيتية، وبنجر السكر، والبطاطس) حوالي ٤٩٠ طن في أوروبا (٢٥ دولة) و٥ مليار طن في جميع أنحاء العالم.

تمثل نفايات خشب الغابات حجماً كلياً يوازي تقريباً كمية الخشب التي يتم استغلالها. فهي تصل إلى نحو ٣,٢ مليار طن من المادة الجافة في جميع أنحاء العالم، أي ١ جيجا طن من المكافئ النفطي (٠,٤٣ طن مكافئ/ طن مادة جافة).

وتكون كمية الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية التي يمكن أن تكون متاحة لذلك كبيرة. ولا يتنافس إنتاج الوقود الحيوي في هذه الحالة مع التطبيقات الغذائية. ويمثل جمع الكتلة الحيوية وتنظيم الخدمات اللوجستية المناسبة الصعوبة الرئيسة. قد يكون هناك أيضاً منافسة مع غيرها من التطبيقات: الاستخدام المباشر للكتلة الحيوية في المراجل للإنتاج المباشر للطاقة، والتطبيقات في صناعة الورق واللب، واستخدامها لإنتاج المواد والكيماويات.

على الرغم من أنها تحتاج إلى مزيدٍ من الأراضي، فإن المحاصيل قصيرة التناوب (الميسكانثاس، والأجمات قصيرة التناوب، ...إلخ) تقدم إمكانية جيدة. وعلاوةً على ذلك، فإنه يبدو من الممكن استخدام الأراضي غير المناسبة تماماً للأغراض الزراعية. ويمكن خفض كميات المياه، والأسمدة، ومنتجات مكافحة الآفات، ومن ثم فإنه يمكن لمثل إنتاج الكتلة الحيوية هذا أن يصبح جذاباً في المستقبل. وتظل إمكانيتها المحتملة في المستقبل صعبة التقييم.

(١٢,٧) إنتاج الإيثانول من الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية

Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass

(١٢,٧,١) مخطط التحويل العام Overall Conversion Scheme

تتألف الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية من ثلاثة بوليمرات: السليولوز، والهيميسليولوز، واللجنين. والسليولوز هو بوليمر خطي متجانس من وحدات دي-جلوكوبيرانوز. وكما هو الحال في النشا، فإن الجلوكوز هو العنصر التركيبي الأساسي. ويمكن استرجاع الجلوكوز بالتحليل المائي، ولكن يكون إجراء التحليل المائي أكثر صعوبة منه في حالة النشا لأن الروابط تكون أكثر استقراراً [٩]. وعلاوةً على ذلك؛ نظراً لتكوين الروابط الهيدروجينية بين السلاسل المتوازية، تشكل جزيئات السليولوز تركيباً صلباً في الليفات، والتي يكون من الصعب كسرها. وهذا هو القيد الرئيس في عملية التحويل. وتحتوي الهيميسليوليزات أحياناً على محتويات بنتوز كبيرة، والتي لا يمكن استخدامها مباشرةً بواسطة سلالات السكاروميسيس التقليدية لإنتاج الإيثانول. ولا يمكن تحويل اللجنين إلى الإيثانول.

تعتمد نسبة هذه الأجزاء الثلاثة الموجودة على النبات المستخدم، كما هو مبين في الجدول رقم (١٢,٤). تمتزج هذه الأجزاء الثلاثة في تركيبٍ واحد، مما يحد من وصول الإنزيمات إلى السليولوز. ولذلك فمن الضروري أولاً أن يتم كسر المصفوفة المكونة من هذه البوليمرات الثلاثة من خلال خطوة معالجة مسبقة. خلال هذه المعالجة يكون من الضروري تجنب تحليل السكريات حرارياً إلى مركبات قد تكون سامة للخمائر المستخدمة في التخمير أو قد تمارس تأثيراً تثبيطياً على الإنزيمات.

بعد خطوة المعالجة المسبقة، يتم تحويل السليولوز إلى جلوكوز في وجود الإنزيمات. ويخضع الإيثانول المنتج من الجلوكوز عن طريق التخمير إلى التقطير والتنقية النهائية.

الجدول رقم (٤ , ١٢). تركيب الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية.

الكتلة الحيوية	اللجنين (٪)	السليولوز (٪)	الهيميسليولوز (٪)
الخسب اللين	٣٠-٢٧	٤٢-٣٥	٣٠-٢٠
الخشب الصلب	٢٥-٢٠	٥٠-٤٠	٢٥-٢٠
قش القمح	٢٠-١٥	٤٣-٣٠	٢٧-٢٠

(٢ , ٧ , ١٢) المعالجة المسبقة للكتلة الحيوية Biomass Pretreatment

تهدف خطوة المعالجة المسبقة إلى جعل السليولوز في متناول الإنزيمات. وفي حالاتٍ معينة، فإنها تفصل جزء السليولوز من جزء الهيميسيلولوز، والذي يمكن استخلاصه في الطور السائل. تستخدم حالياً عمليتين رئيستين للمعالجة المسبقة:

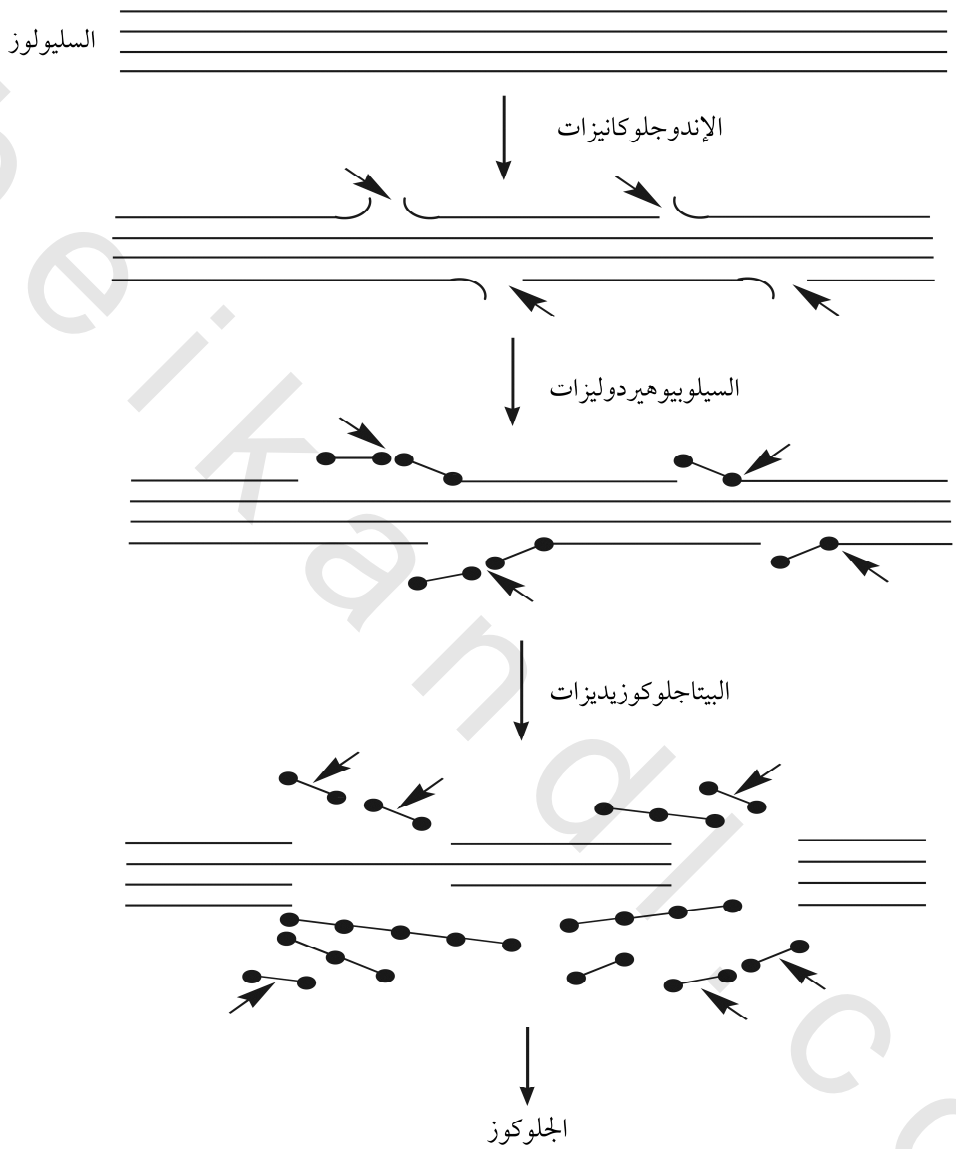
- في حالة التحليل الحمضي المسبق، يتم معالجة الكتلة الحيوية في وجود محلول حمضي مخفف (يحتوي على ٣ , ٠-٢٪ من حمض الكبريتيك أو الهيدروكلوريك)، في درجة حرارة معتدلة حوالي ١٥-٢٠ دقيقة. تتحلل الهيميسليولوزات تقريباً تماماً. ويتم أيضاً تحويل جزء صغير من اللجنين. ويجري التحقق من العمليات التي تشمل خطوة ثانية تعمل في درجات حرارة أعلى (٢٤٠ درجة مئوية) ومدة أقصر (٢-٣ دقائق) من أجل تحسين نوعية الفصل.
- يتمثل انفجار البخار في تعريض المادة إلى ضغطٍ عالٍ (١٥-٢٣ بار) ودرجة حرارة عالية (١٨٠-٢٤٠ درجة مئوية) في وجود البخار لفترة قصيرة ومن ثم توسيع البخار فجأة، من أجل كسر تركيب المصفوفة اللجنوسليولوزية. ويحدث تحليل جزئي للهيميسليوليزات (خاصةً في الظروف معتدلة الحمضية) وانصهار للجنين خلال مرحلة التسخين عالية الحرارة. وتحدث إعادة تكثيف للجنين خلال مرحلة التوسيع السريعة. وتحد فترة الوقت القصيرة من كمية منتجات التحليل.

(٣ , ٧ , ١٢) التحليل الإنزيمي Enzymatic Hydrolysis

يعد التحليل الإنزيمي للسليولوز مجال التنمية الرئيس في الوقت الحاضر. وهناك حاجة إلى ثلاث أنواع من الإنزيمات لتحقيق التحليل الكامل للسليولوز إلى جلوكوز (الشكل رقم ٥ , ١٢):

- تفصل الإندوجلوكانيزات سلاسل السليولوز بطريقة عشوائية.
- تحرر السيلوبيوز هيدروليزات ثنائيات الجلوكوز على طرفي سلسلة السليولوز.
- تنتج البيتا-جلوكوسيديزات الجلوكوز من السلاسل الأوليجومرية القصيرة.

ويتم إنتاج السليوليزات عادةً بواسطة الفطريات من نوع الترايكوديرما. وتعد هذه حالياً منطقة نشطة جداً في البحوث.



الشكل رقم (٥, ١٢). عمل الإنزيمات السليولوزية على ألياف السليولوز الدقيقة.

(٤, ٧, ١٢) تخمير الجلوكوز والبنتوزات Fermentation of Glucose and Pentoses

يمكن تحويل الجلوكوز الذي تم الحصول عليه بواسطة التحليل المائي إلى إيثانول عن طريق نفس نوع العملية المستخدمة في حالة الجلوكوز الذي تم الحصول عليه من النشا. وتنشأ الاختلافات الرئيسة من انخفاض

تركيز الجلوكوز الأولي ووجود بعض الملوثات (مثل الفورفورال، وهيدروكسي ميثيل الفورفورال وحمض الخليك) القادمة من خطوة المعالجة المسبقة، والتي قد يكون لها تأثير مثبط.

عند تحويل الجلوكوز إلى إيثانول، يتم استخدام السليولوز فقط، وهو ما يمثل في معظم الحالات أقل من ٥٠٪ من المواد الخام الأولية، كما هو مبين في الجدول رقم (١٢, ٤).

ولذلك تجرى الأبحاث على تطوير عمليات قادرة على تحويل البنتوزات التي تم الحصول عليها من الهيميسليولوزات إلى إيثانول. وقد تم تعديل الخمائر وراثياً من أجل إدراج الجينات المناسبة. وكانت الإنتاجية التي تم الحصول عليها منخفضة للغاية للتطبيقات على المستوى الكبير ولكن تشير التطورات الحديثة جداً إلى أن الاستخدامات الصناعية يمكن أن تحدث لاحقاً. وأجريت محاولات أخرى على التعديل الوراثي للبكتيريا، ولكن لا توجد حتى الآن تطبيقات صناعية متاحة [٧].

وقد عرفت عملية الأسيتون-البيوتانول-الإيثانول (ABE) لسنواتٍ عديدة ولكن كانت الإنتاجية والعائدات أقل من عمليات إنتاج الإيثانول. ومع ذلك، فإن البيوتانول الحيوي له مزايا كوقود حيوي مقارنةً بالإيثانول: خليط بخار أقل، وذوبان أقل في الماء، وحرارة احتراق حجمية أعلى. ولذلك فيمكن إدراجه في تجمع البنزين بسهولةٍ أكبر من الإيثانول. وقد شكلت مؤخراً شركة BP ودوبونت مشروعاً جديداً لتطوير تصنيع وتسويق البيوتانول الحيوي [٨].

(١٢, ٨) إنتاج الوقود الحيوي من خلال المسار الكيميائي الحراري

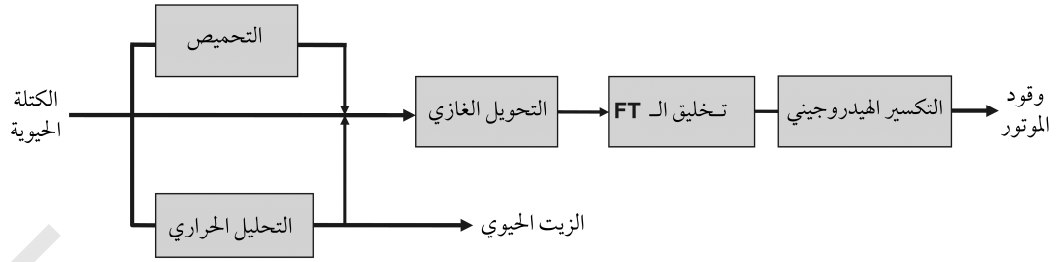
Production of Biofuels Through the Thermochemical Pathway

(١٢, ٨, ١) الوضع الحالي Present Status

يتميز المسار الكيميائي الحراري باستخدام تحويلات عالية الحرارة (٥٠٠-١٥٠٠ درجة مئوية)، مثل الانحلال الحراري أو التحويل للغاز. ويمكن تطبيقه في أي مواد أولية لجنوسليولوزية.

ويتم إنتاج الغاز الاصطناعي المكون بواسطة خليط من أكسيد الكربون والهدرجة في وجود الأوكسجين. ويمكن بعد ذلك تحويل الغاز الصناعي إلى الوقود السائل باستخدام عملية فيشر-تروبش التي تنتج الشموع، تليها مرحلة التكسير الهيدروجيني لتحويل الشموع إلى وقود للسيارات كما هو مبين في الشكل رقم (١٢, ٦).

وغالباً ما تسمى هذه العملية لإنتاج الوقود الاصطناعي من الكتلة الحيوية عملية BtL (الكتلة الحيوية-إلى-السوائل) تشبهاً بالعملية المستخدمة لإنتاج الوقود الاصطناعي من الغاز الطبيعي (الغاز-إلى-السوائل، GtL) أو من الفحم (الفحم-إلى-السوائل، CtL).



الشكل رقم (٦ , ١٢). المسار الكيميائي الحراري لإنتاج الوقود السائل من الكتلة الحيوية.

يمكن استخدام الانحلال الحراري و/ أو التحميص للمعالجة المسبقة للكتلة الحيوية قبل التحويل للغاز، وذلك لتحويل الكتلة الحيوية إلى مرحلة متجانسة يمكن حقنها بسهولة إلى جهاز التغويز. ومن الممكن أيضاً تحويل الكتلة الحيوية محلياً، وذلك لجعل نقل المنتج إلى جهاز التغويز أسهل.

ويمكن استخدام الانحلال الحراري السريع لإنتاج سريع زيت حيوي. ولا يمكن أن يستخدم مثل هذا الزيت الحيوي مباشرةً حيث إنه يحتوي على الكثير من المنتجات غير المرغوبة في الوقود الحيوي (على سبيل المثال، الفينولات، والسكريات، والكحولات، والأحماض العضوية، والمركبات العطرية).

ويتم إجراء البحوث لإيجاد وسيلة لتحويل مثل هذه "الزيوت الحيوية" إلى وقود للسيارات بواسطة الهدرجة. في الوقت الحاضر، لم تثبت حتى الآن إمكانية استخدام مسار التحويل "المباشر" هذا؛ نظراً لكمية الهيدروجين الكبيرة المطلوبة ولطبيعة المنتجات.

(٢ , ٨ , ١٢) الانحلال الحراري والتحميص Pyrolysis and Torrefaction

يستخدم الانحلال الحراري الحرارة لتحليل الكتلة الحيوية إلى ثلاث مراحل: الصلبة (الفحم)، والسائلة (الزيت الحيوي)، والغاز (غالباً ثاني أكسيد الكربون، وأول أكسيد الكربون، والهيدروجين والميثان). وتتوقف نسبة المراحل الثلاث التي يتم الحصول عليها بذلك على درجة الحرارة ومدة البقاء (أو سرعة التسخين). ويوضح الجدول رقم (٥ , ١٢) العائدات النموذجية التي تم الحصول عليها لسرعات التسخين المختلفة.

الجدول رقم (٥ , ١٢). مقارنة بين ظروف التحليل الحراري المختلفة.

	سرعة التسخين	درجة الحرارة	عائد الإنتاجية الأساسي	عائد الطاقة
الانحلال الحراري البطيء	<٥٠°/ دقيقة	٥٠٠°	فحم (<٣٥٪)	٦٠٪
الانحلال الحراري السريع	>١٠٠°/ ثانية	٥٠٠°	زيت حيوي (٥٠-٨٠٪)	٧٥٪
التحويل للغاز حرارياً	>١٠٠°/ ثانية	٨٠٠°<	غاز (>٧٠٪)	٩٠٪

openkandil.com

ويعطي الانحلال الحراري البطيء، والذي هو أفضل عملية معروفة، مادة صلبة (الفحم). والانحلال الحراري السريع هو حالياً الخيار المفضل لمسار BtL. وهو يشمل الحفاظ على درجة حرارة ٥٠٠° لبضع ثوان.

يمكن نقل الزيت الحيوي و/ أو خليط السائل–الصلب الذي يتم الحصول عليه من الانحلال الحراري السريع بسهولة وحقنه في جهاز التغويز. ويمكن استخدام الغاز الذي يتم إنتاجه لتوفير الطاقة اللازمة للانحلال الحراري. وقد تم تطوير تقنيات مختلفة على نطاقٍ تجريبي باستخدام الوسادة المتخلخلة (Dynamotive)، والوسادة المنتشرة (Ensyn, VTT)، والخروط الدوار (جامعة تفينتي، BtG)، والسيكلون (TNO)، واللولب المزدوج (FZK)، أو مفاعل الجر.

ويتم إجراء التحميص في ظروف خطوة التجفيف النهائي. يتم زيادة درجة الحرارة تدريجياً لتصل إلى الصعيد النهائي بين ٢٤٠ و٣٠٠ درجة مئوية. يتراوح وقت البقاء ما بين بضع دقائق وساعة، وفقاً لدرجة الحرارة. وحيث إنها تتم في درجات حرارة أقل بكثير من تلك المستخدمة في الانحلال الحراري، فإن العملية تكون أقل كثافة للطاقة بكثير.

ويقلل التحميص من المتانة الميكانيكية للكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية. ونتيجةً لذلك يصبح طحنها أسهل بكثير وعليه فمن الممكن الحصول على مادة صلبة مقسمة بدقة متناهية، ومناسبة لبعض تقنيات التحويل للغاز.

(١٢,٨,٣) إنتاج وقود السيارات الاصطناعي من الكتلة الحيوية

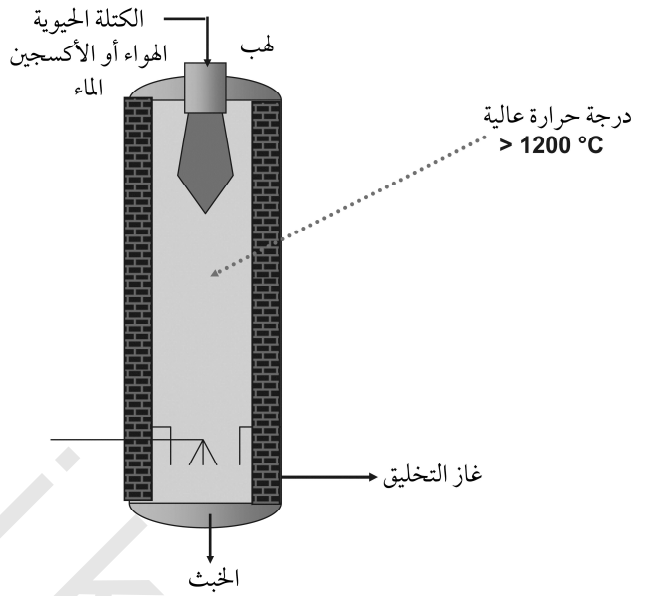
Production of Synthesis Motor Fuels from Biomass

تتعرض الكتلة الحيوية في درجات الحرارة العالية أولاً لعملية التحلل. ثم يتم أكسدتها في وجود الأوكسجين أو الماء وتشكل خليط من أكسيد الكربون، وثاني أكسيد الكربون، والهيدروجين. وتكون درجات الحرارة العالية بين ١٢٠٠ و١٣٠٠° مطلوبة للقضاء على القطران أو المركبات الحمضية من الغاز الاصطناعي الذي تم الحصول عليه. يعني هذا أن هناك حاجة لوجود الأوكسجين، من أجل الوصول إلى درجات الحرارة العالية. ويبدو أن أجهزة التغويز مجرورة التدفق هي الأفضل تكيفاً للتطبيقات كبيرة المدى.

وقد تم تطوير أول جهاز تغويز مجرور التدفق لتحويل الفحم إلى غاز بواسطة شركة كوبرس منذ ما يقرب من ٥٠ عاماً. تم إدخال الفحم إلى جهاز التغويز مع الأوكسجين من خلال أزواج من الشعلات المتقابلة في أسفل جهاز التغويز ويتم إنتاج الغاز الاصطناعي في الأعلى. وتم استنباط عملية شركة شيل لتحويل الفحم إلى غاز وعملية شركة برينفلو من هذا المفهوم الأولي. وهما تعملان عند ضغطٍ عالٍ (٣٠–٤٠ بار) وبكفاءة عالية [٩].

وقد تم تطوير مفاعل مجرور سفلي التدفق في ألمانيا بداية من قبل نويل وبعد ذلك شركة فيوتشر المحدودة للطاقة. وهذا المفهوم موضح في الشكل رقم (١٢,٧). بعد السقي بالماء، يتم استرجاع الغاز الاصطناعي والرماد في الجزء السفلي من المفاعل. ويتم الحصول على الرماد في صورة سائلة (الخبث).

obeikandl.com



الشكل رقم (٧, ١٢). المفاعل المجرور سفلي التدفق.

يمكن استخدام مثل هذا المفاعل مباشرةً لتحويل الكتلة الحيوية إلى غاز طالما يمكن تشغيله في ظروف غير خبثية داخل المفاعل. يمكن للخبث ورماد الكتلة الحيوية المنصهرة أن تذيب الطبقة المقاومة للصهر. ولذلك يجب أن تكون المواد الأولية منخفضة المحتوى من الرماد. ويمكن تلبية هذا الشرط باستخدام الزيت الحيوي، ولكنه يكون أكثر صعوبة في وجود الفحم [٩].

كذلك يجب أن يعامل الغاز الاصطناعي قبل إرساله إلى قسم تخليق فيشر-تروبش. ويجب أن تتم إزالة الجزيئات الصلبة بواسطة الترشيح. وتتم إزالة الملوثات الحمضية مثل حمض الهيدروكلوريك، وحمض الهيدروفلويك، والسيانيد، وكبريتيد الهيدروجين، وكبريتيد الكربونيل بواسطة الغسل بالمذيبات. وتتحقق خطوة التنقية النهائية باستخدام المراحل الصلبة التفاعلية.

يوجب أيضاً تعديل نسبة الهيدروجين-إلى-الكربون في الغاز الاصطناعي المرسل إلى قسم فيشر-تروبش. ويمكن استخدام خطوة تحول انتقالية والتي يتفاعل أكسيد الكربون خلالها مع الماء لهذا الغرض.

تم تطوير تخلق فيشر-تروبش على نطاقٍ صناعي أثناء الحرب العالمية الثانية. وتم استعماله بعد ذلك على نطاقٍ واسع من قبل شركة ساسول في جنوب أفريقيا لإنتاج وقود السيارات من الفحم؛ نتيجة للحصار المفروض على جنوب أفريقيا في ذلك الوقت. وقد تم تطوير تقنيات مختلفة (شيل، وستات أويل، وساسول، وإكسون، وIFP/ENI).

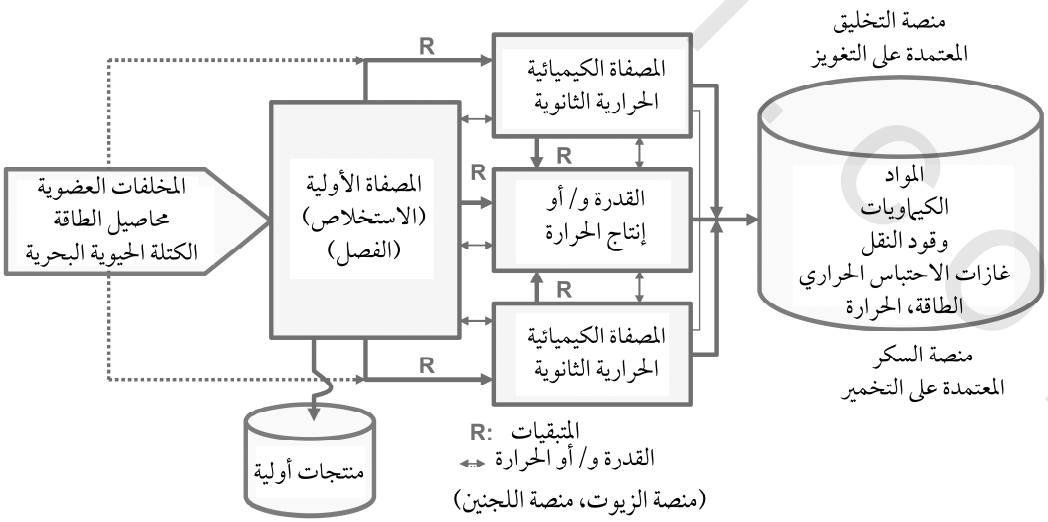
تتطلب عملية تخليق فيشر-تروبش حافزاً. يستخدم نوعان من المحفزات: تعتمد على الحديد أو الكوبالت. وتستخدم معظم العمليات الحديثة التحفيز بالكوبالت، والذي يفضل تكوين الهيدروكربونات طويلة السلسلة (الشموع). وبعد ذلك تكون هناك حاجة لخطوة تكسير هيدروجيني خفيفة للحصول على وقود السيارات، ووقود الديزل، والكيروسين.

ويكون وقود الديزل المنتج من خلال هذه العملية من نوعية عالية جداً. وهو لا يحتوي على الكبريت أو النتروجين أو المواد العطرية، وله رقم سيتان عالي (حوالي ٧٠).

(١٢,٩) المصافي الحيوية Biorefineries

إن نمو سوق الوقود الحيوي يجب أن يؤدي في المستقبل إلى تطوير نظم إنتاج أكثر تعقيداً وأكثر تكاملاً. وسوف تكون مثل هذه "المصافي الحيوية" قادرة على إنتاج مجموعة واسعة من الوقود والمنتجات الثانوية من مواد أولية مختلفة، في حين يتم حالياً إنتاج وقود حيوي واحد في وحدة قائمة بذاتها من مادة أولية واحدة (عادةً FAME من زيت بذور اللفت).

في مثل هذه المصافي الحيوية سوف يكون من الممكن النظر في دمج العمليات الكيميائية الحرارية والعمليات الحيوية الكيميائية كما هو مبين في الشكل رقم (١٢,٨). وسيكون أيضاً من الممكن دمج تحول الكتلة الحيوية في مصفاة للنفط ولمعالجة النفط والكتلة الحيوية معاً، أو الجمع بين إنتاج الوقود الحيوي مع تحولات الكتلة الحيوية الأخرى، مثل مصانع السكر أو مصانع اللب والورق.



الشكل رقم (١٢,٨). مصفاة حيوية تدمج العمليات الحيوية الكيميائية والكيميائية الحرارية. من تقرير رؤية المجلس الإستشاري لبحوث الوقود الحيوي [٢].

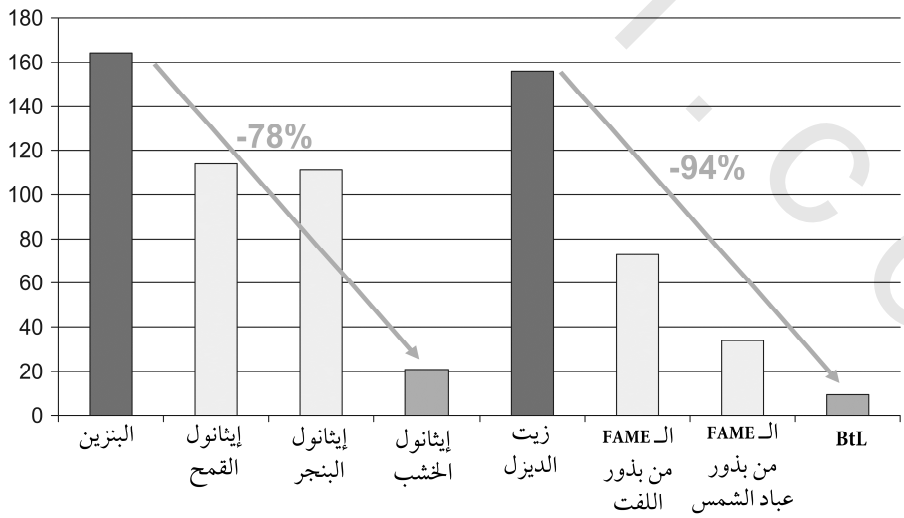
وبعض المصافي الحيوية البسيطة نسبياً موجودة بالفعل (على سبيل المثال، مصانع السكر/الإيثانول، ومصانع طحن بذور الزيت/الأسترة الناقلة، ومصانع اللب والورق، ووحدة وقود الديزل الحيوي المدمجة في مصفاة النفط)، ولكن يبقى الكثير من البدائل التي لا يزال يتعين اكتشافها.

إن تعدد توليد الطاقة، والهيدروجين، والوقود الحيوي هي أيضاً إمكانية جذابة في حالة التحول الكيميائي الحراري للكتلة الحيوية من خلال إنتاج الغاز الاصطناعي.

(١٢,١٠) الوقود الحيوي والاستدامة Biofuels and Sustainability

تعد الاستدامة قضية حاسمة، حيث يجري مناقشة كلاً من المزايا والعيوب المحتملة للبيئة غالباً. والشواغل الرئيسة التي أعرب عنها هي المنافسة مع تطبيقات المواد الغذائية والأثر السلبي المحتمل على البيئة. بكل وضوح، يمكن أن يتحقق معدل انتشار كبير للوقود الحيوي فقط إذا أمكن إنتاج الوقود الحيوي بطريقة مستدامة.

إن تطوير عمليات التحويل من الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية مهم جداً؛ لأنه يجعل من الممكن تجنب المنافسة مع التطبيقات الغذائية. كما أنه أيضاً يجعل من الممكن تحسين توازن ثاني أكسيد الكربون على أساس البئر-إلى-العجلة، كما هو موضح في الشكل رقم (١٢,٩) [١٠]. ويمكن الاطلاع على المعلومات الأساسية حول هذا الموضوع أيضاً في مكانٍ آخر [١١-١٤]. وسوف يصبح الحد من انبعاثات ثاني أكسيد الكربون العالمية لكل وحدة طاقة ممكناً من ٧٥٪ إلى أكثر من ٩٠٪ وذلك من خلال إنتاج الوقود الحيوي من الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية [١٥، ١٦].



الشكل رقم (١٢,٩). انبعاثات ثاني أكسيد الكربون لكل وحدة طاقة لمختلف أنواع الوقود الحيوي. من JRC/EUCAR/CONCAWE ٢٠٠٦م [١٠].

بالإضافة إلى ذلك، يجب أن تؤخذ معايير أخرى أيضاً في الاعتبار. يجب إنتاج الكتلة الحيوية بطريقةٍ مستدامة، لتجنب حدوث أضرار دائمة للتربة، أو أي تحول قد يكون له أثر سلبي على البيئة، مثل إزالة الغابات.

وتشمل القضايا المهمة الأخرى استهلاك المياه والمنافسة المحتملة للموارد المائية، واستخدام الأسمدة، وتقنيات مكافحة الآفات التي قد تضر البيئة. ولذلك، سيكون من المهم في المستقبل إدخال نظام شهادة، وإنفاذ الامتثال لمعايير الاستدامة من هذا القبيل.

(١١, ١٢) الاستنتاج Conclusion

يمثل الوقود الحيوي، خلال الفترة الانتقالية الحالية، خياراً جذاباً للحد من اعتماد الدول المستهلكة للطاقة على واردات النفط ولتحسين توازن ثاني أكسيد الكربون على حدٍ سواء.

وتتطلب الزيادة الكبيرة في إنتاج الوقود الحيوي تطوير عمليات تحويل مبتكرة لتحويل الكتلة الحيوية اللجنوسليولوزية. ويمكن أن تساعد مثل هذه العمليات أيضاً على زيادة المزايا البيئية للوقود الحيوي، ولكن ستكون هناك حاجة للتأييد الشعبي لتطوير هذه المسارات الجديدة حيث إن التحديات المهمة التقنية والاقتصادية لا تزال قائمة.

من أجل السيطرة على التأثير على البيئة، فإنه سوف يكون من الضروري تطوير أساليب تقييم دقيقة لمعايير الاستدامة وخلق أطر تنظيمية مناسبة لتنفيذ تطبيقها.

المراجع References

[١] International Energy Agency (2006) *World Energy Outlook*, International Energy Agency, Paris.

[٢] European Commission (2006) Biofuels in the European Union–A vision for 2030 and beyond, EUR 22066, Directorate-General for Research, Sustainable Energy Systems.

[٣] Ballerini, D., *et al.* (2006) *Les Biocarburants-É tat des lieux, perspectives et enjeux du développement*, Technip, Paris.

[٤] Stephane, H. (2007) New biofuel technologies, Panorama IFP.

[٥] Fulton, L., Howes, T., and Hardy, J. (2004) *Biofuels for Transport-An International Perspective*, International Energy Agency, Paris.

[٦] Mansfield, S.D., Mooney, C., and Saddler, J.N. (1999) Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysos. *Biotechnol. Prog.*, **15,** 804-816.

[٧] Jeffries, T.W. (2006) Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr. Opin. Biothechnol.*, **17,** 320-326.

[٨] Cascone, R. (2007) Biofuels: what is beyond ethanol and biodiesel? *Hydrocarbon Processing*, **86,** 95-110.

[٩] Knoef, H.A.M. (2005) *Handbook Biomass Gasifi cation*, BTG Biomass Technology Group BV, Enschede.

[١٠] EUCAR, JRC, and CONCAWE (2004) Well to Wheel Analysis of future automotive fuels and powertrains in the European context.

[١١] Quirin, M., *et al.* (2004) CO_2 Mitigation through Biofuels in the Transport Sector. Main report executed by IFEU-Institut für Energie-und Umweltforschung Heidelberg GmbH.

obeikandl.com

[١٢] Viewls Project (2005) Environmental and economic performance of biofuels, Volume I-Main report.
[١٣] Viewls Project (2005) Environmental and economic performance of biofuels, Vol. II-Appendices.
[١٤] CONCAWE (2002) Energy and greenhouse gas balance for Europe-an update, CONCAWE report no. 2/02, April, 2002.
[١٥] Lin, Y. and Tanaka, S. (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69,** 627-642.
[١٦] Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., and Pretorius, I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66,** 506-577.

obeikandl.com

الفصل الثالث عشر

الجوانب البيئية والاقتصادية للتقنية الحيوية الصناعية

ENVIRONMENTAL AND ECONOMIC ASPECTS OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY

باربرا ج. هيرمان، فيرونيكا دورنبورج، و مارتين ك. باتيل

Barbara G. Hermann , Veronika Dornburg , and Martin K. Patel

(١٣, ١) المقدمة Introduction

يتم إنتاج المواد الكيميائية والوقود حالياً بشكلٍ حصري تقريباً من مواد البتروكيماويات الأولية المستمدة من النفط الخام والغاز الطبيعي. يمكن أن يقلل إنتاج نفس المواد الكيميائية والوقود أو المكافئ لها وظيفياً من الموارد المتجددة من الأثر البيئي، على سبيل المثال انبعاثات غازات الاحتباس الحراري. وفي ضوء ارتفاع أسعار النفط؛ وكذلك أهداف الحد من الانبعاثات طويلة المدى، على سبيل المثال، هدف الاتحاد الأوروبي للحد من انبعاثات ثاني أكسيد الكربون بنسبة ١٥-٣٠٪ بحلول عام ٢٠٢٠م، يمكن أن تسهم التقنية الحيوية الصناعية (تسمى أيضاً "التقنية الحيوية البيضاء") المستخدمة لإنتاج مواد أو وقود اعتماداً على الموارد الحيوية بشدة في تحقيق أهداف الحد من الانبعاثات وكذلك نحو تقليل الاعتماد على الموارد الأحفورية المكلفة.

وهناك بالفعل الكثير من تطبيقات التقنية الحيوية لإنتاج المواد الكيميائية الدقيقة والمواد الكيميائية المتخصصة، المنطقة التي من المتوقع أن تتسع إلى حدٍ كبير على المدى القصير إلى المدى المتوسط. وفي المقابل، فإن هناك عدم يقين أكثر بشأن متى، وكيف، وإلى أي حد سوف تؤدي التقنية الحيوية أيضاً دوراً في إنتاج المواد الكيميائية الضخمة.

في السنوات الأخيرة، اتخذت خطوات مهمة في معاهد البحوث والشركات، والسياسة، بهدف تطوير وتطبيق التقنية الحيوية الصناعية في إنتاج المواد الكيميائية والوقود، مما أدى إلى توقعات عالية في المجال. وتم فتح آفاق وفرص جديدة بواسطة التقدم الأخير، ويرجع ذلك في المقام الأول إلى زيادة إنتاجيات وعائدات التخمير. ومن المتوقع تحقيق مزيد من التقدم المهم في هذا المجال، خصوصاً فيما يتعلق بالكائنات الحية الدقيقة المعدلة وراثياً.

وفي حين أن هناك توجهاً قوياً وراء هذه التطورات، فإن هناك حتى الآن فقط معلومات قليلة جداً متاحة في المجال العام على الآثار الحالية والمستقبلية الاقتصادية والبيئية والاجتماعية للتقنية الحيوية الصناعية. ركزت كل الدراسات التي تم نشرها تقريباً على منتج واحد، غالباً وقود الإيثانول [١٤، ٣٤] ولكن أيضاً على حمض البولي لاكتيك [٤، ٤٣]، وبولي هيدروكسي ألكانوات [٢، ١٥]. ومع ذلك، فإن هذه الدراسات ليست مقارنة بسهولة؛ بسبب اختلاف الافتراضات والمنهجيات. وعلاوةً على ذلك، يتم تجاهل التحسينات المستقبلية في التقنية على الرغم من أنها قد تقلل بشكلٍ كبير من الآثار البيئية، والاقتصادية، والاجتماعية. وللتغلب على هذه المشكلات فإننا نقدم ونطبق نهجاً عاماً والذي يسمح بتقدير الآثار البيئية والاقتصادية اعتماداً على المدخلات من المواد الأولية والطاقة للعملية [١١، ٢٧].

واستند اختيار المنتجات في هذا الفصل على ثلاثة معايير هي: (أ) جدوى الإنتاج عن طريق التخمير، (ب) المعلومات المتاحة عن حركيات هذه العملية، والإنتاجية، والتركيز في محلول التخمير، و(ج) إمكانية بيعها بكميات كبيرة على المدى المتوسط أو الطويل (انظر [١١، ٢٧] لمزيدٍ من التفاصيل). تمت دراسة المنتجات التالية: ١،٣-بروبان دايول (PDO)، وحمض الخليك، وحمض الأديبيك، والبيوتانول (من عملية الأسيتون-بيوتانول-إيثانول [ABE])، والإيثانول، وحمض اللاكتيك، والبولي هيدروكسي ألكانوات (PHA)، وحمض السكسينيك. وبالإضافة إلى ذلك، تم أخذ أربعة منتجات تتكون من التحويل الكيميائي اللاحق لهذه المنتجات في الاعتبار: الإيثيل لاكتات (EL)، والإيثيلين، وحمض البولي لاكتيك (PLA)، وبولي ثلاثي الميثيلين رباعي الفيثالات (PTT).

(١٣,٢) المنهجية Methodology

(١,٢,١٣) النهج العام Generic Approach

(١,١,٢,١٣) الخلفية المنهجية Methodological Background

النهج العام هو وسيلة تتيح إجراء مقارنات معيارية بين مختلف العمليات على أساس عدد محدود من العناصر. ويمكن بعد ذلك إجراء الكثير من الحسابات على أساس عدد محدود من البيانات المدخلة وقاعدة البيانات التي تقوم عليها. يتيح هذا النهج العام التقدير المسبق للجدوى الاقتصادية فضلاً عن الآثار البيئية لعمليات التقنية الحيوية والتي لا تتواجد لها بيانات المصنع التجريبي حتى الآن أو التي لا تتاح بيانات عملياتها علنياً. ويمكن تطبيق هذه الطريقة للعمليات التي تمثل الحالة الراهنة للتقنية فضلاً عن التقنية المستقبلية. ويمكن بعد ذلك مقارنة نتائج هذا النهج العام بنتائج منتجات التقنية الحيوية الصناعية التي يتم حسابها باستخدام البيانات الصناعية و/ أو ما يعادلها من البتروكيماويات.

الخطوة الأولى من النهج العام هي إعداد مخطط لسير العملية الحيوية، والتي تحول سكر التخمير إلى كيماويات التقنية الحيوية الصناعية المستهدفة. ووفقاً للمبدأ الذي اقترحه لاندوسي وليند [١٦، ٢١]، تحتوي مخططات سير العملية هذه على الوحدات النمطية القياسية (مثل التخمير، والترشيح الفائق، والتبخير). يمكن تعيين ميزان الكتلة الذي يحتوي على كميات جميع المدخلات والمخرجات على مستوى عملية الوحدة لكل مخطط سير عملية يمثل طريق منتج واحد (انظر الأقسام ١٣,٢,١,٢ و١٣,٢,١,٣). وعلى هذا الأساس، يمكن إجراء التقييم البيئي (انظر القسم ١٣,٢,٢) وتقدير التكاليف المتصلة بجميع المدخلات وتكاليف الاستثمار وحساب تكاليف الإنتاج الإجمالية (انظر القسم ١٣,٢,٣).

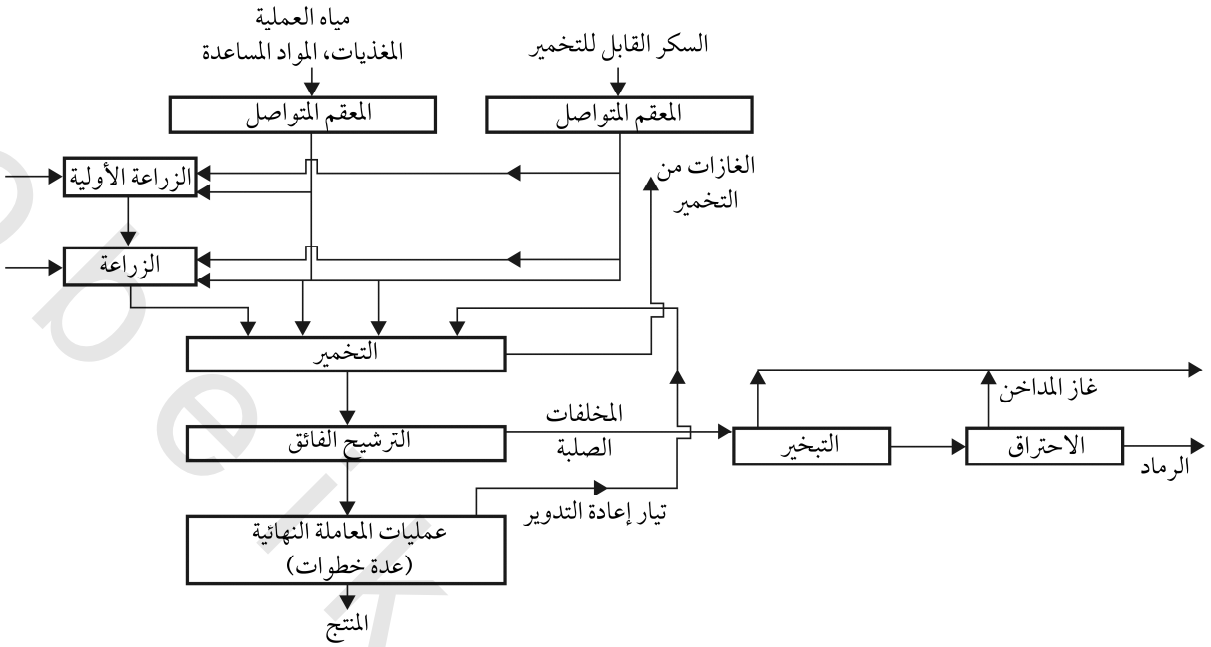
ومن أجل ضمان إمكانية المقارنة بين النتائج، فإنه يجب استخدام قاعدة بيانات مشتركة لمدخلات العملية لجميع العمليات الحسابية. وتتكون قاعدة البيانات هذه من بيانات الخلفية البيئية على إمكانية ارتفاع درجة حرارة الكرة الأرضية واستخدام الطاقة غير المتجددة وكذلك أسعار السوق للمواد الكيميائية، والعوامل المساعدة/ المرافق وسكر التخمير (انظر الأقسام ١٣,٢,٣,١ و١٣,٢,٣,٢). وكانت الوحدة الوظيفية هي طن واحد[1] من المادة الكيميائية العضوية عند بوابة المصنع. ثم يتم مقارنة هذه الوحدة الوظيفية بسهولة إلى إنتاج نفس المادة الكيميائية الحالي من البتروكيماويات أو المكافئ الوظيفي.

(١٣,٢,١,٢) تصميم العملية لطرق التقنية الحيوية الصناعية

Process Design of Industrial Biotechnology Routes

تم وضع مخططات منفصلة لسير العملية للتقنيات الحالية والمستقبلية، فيما يتعلق بكلٍ من عمليات التخمير وعمليات التجهيز النهائي لفصل وتنقية المنتج. وتتكون جميع مخططات سير العملية (المعدة على مستوى عمليات الوحدة) من الأقسام التالية (الشكل رقم ١٣,١): قطارات الزراعة والتلقيح (توفير الكائنات الحية الدقيقة)، والتخمير (تحويل سكر التخمير إلى المنتج المستهدف والمنتجات الثانوية)، والترشيح (إزالة المنتجات الثانوية الصلبة) والتجهيز النهائي (عدة خطوات، لتنقية المنتج المستهدف). ومواد المدخلات إلى النظام هي سكر التخمير، والماء، والمواد الغذائية، والمواد المساعدة، والمرافق مثل الكهرباء والبخار. وكانت النواتج هي المنتج المستهدف فضلاً عن النفايات الصلبة ومياه الصرف.

(١) كل وحدات الطن المذكورة في هذا الفصل هي طن متري (حوالي ١,١٠٢ طن قصير).



الشكل رقم (١ ,١٣). مخطط سير عملية مبسط كما يستخدم في النهج العام.

(١ ,٢ ,١٣) الافتراضات التقنية لطرق التقنية الحيوية الصناعية

Technology Assumptions for Industrial Biotechnology Routes

عند إعداد ميزان الكتلة، يتم تقدير تدفقات الكتلة لجميع المكونات استناداً إلى المعايير الأساسية التالية: العائدات، والإنتاجية، وتركيز المحلول لخطوة التخمير (الجدول رقم ١ ,١٣). يحدد تركيز المحلول[٢] كمية المياه في بيئة التخمير وعليه يؤثر في الطاقة المطلوبة في التجهيز النهائي. وهو يحدد مع الإنتاجية[٣] زمن البقاء فضلاً عن حجم معدات التخمير. ولا يؤثر العائد[٤] على المدخلات المطلوبة من سكر التخمير فحسب ولكن أيضاً على كمية نفايات الكتلة الحيوية المنتجة. يتم فصل نفايات الكتلة الحيوية من مجرى المنتج عن طريق خطوة ترشيح فائق والتي تتبع التخمير مباشرة. يتم تجفيف نفايات الكتلة الحيوية ثم حرقها لإنتاج البخار. ويتم تدوير مياه العملية كلما أمكن ذلك من أجل تفادي الاستهلاك المفرط.

(٢) يعرف تركيز محلول بيئة التخمير بأنه كتلة المنتج بالنسبة إلى الحجم الكلي لمحلول التخمير (جم/ لتر).

(٣) تعرف الإنتاجية بأنها كتلة المنتج مقسومة على حجم بيئة التخمير لكل وحدة من الوقت اللازم لإنتاج هذه الكمية (جم/ [لتر*ساعة]).

(٤) يعرف العائد بأنه كتلة المنتج مقسومة على كتلة سكر التخمير (جم/ جم).

obeikandl.com

الجدول رقم (١ ,١٣). أنواع التخمير والبيانات الرئيسة على التركيز، والإنتاجية، وعائد التخمير للتقنية الحالية والمستقبلية.

المنتج	أنواع التخمير			التركيز (جم/ لتر)	الإنتاجية (جم/ لتر*ساعة)	العائد جم منتج/ جم جلوكوز	المرجع
	حالياً/ مستقبلاً	هوائية/ لاهوائية	دفعة واحدة/ مستمرة				
حمض الخليك	حالياً	لاهوائية	دفعة واحدة	١٨	٠,١٥	٠,٥٠	[١٢، ٢٠]
	مستقبلاً	لاهوائية	مستمرة	٥٠	١٥	٠,٩٠	
حمض الأديبيك	حالياً	هوائية	دفعة واحدة	٢٠	٠,٤٢	٠,١٧	[٢٣]
	مستقبلاً	هوائية	مستمرة	٤٠	١٠	٠,٤٧	
البيوتانول	حالياً	لاهوائية	مستمرة	٢٠	٠,٣٦	٠,٤٢	[٥، ٨، ٣٠]
	مستقبلاً	لاهوائية	مستمرة	٤٥	١٥	٠,٥٠	
الإيثانول	حالياً	لاهوائية	مستمرة	١٠٠	٢,٢٠	٠,٤٦	[٣، ١٠، ٢١]
	مستقبلاً	لاهوائية	مستمرة	١٣٠	٥٠	٠,٤٧	
حمض اللاكتيك	مستقبلاً	لاهوائية	مستمرة	١٨٠	٢٠	٠,٩٥	
PDO	حالياً	هوائية	كلاً منهما	١٠٠	١,٦٧	٠,٤١	[٣٦]
	مستقبلاً	هوائية	مستمرة	١٠٠	١٥	٠,٥٤	
PHA	حالياً	هوائية	دفعة واحدة	١٥٠	٣,٠٠	٠,٣٥	[٢]
	مستقبلاً	هوائية	مستمرة	١٥٠	١٠	٠,٤٣	
حمض السكسينيك	حالياً	لاهوائية	دفعة واحدة	٨٠	١,٨	٠,٨٨	[١٩، ٣٨]
	مستقبلاً	لاهوائية	مستمرة	١٥٠	١٥	١,٠١	

تم وضع افتراضات للعوامل الرئيسة للتقنية الحالية والمستقبلية بوصفها جزءًا من النهج العام فيما يتعلق بعمليات التخمير والتجهيز النهائي (الجدول رقم ١ ,١٣).

١- للتقنية الحالية، تم افتراض كلٍ من عمليات الدفعة الواحدة والعمليات المستمرة واستندت الحسابات على البيانات من الوحدات الصناعية، والمحطات التجريبية، أو تجارب المختبر. اعتمدت قيم العائدات، وتركيز المحلول، والإنتاجية في الجدول رقم (١ ,١٣) لتقنية التخمير الحالية على البيانات المنشورة. ويتم تقسيم أي سكر تخمير لا يتم تحويله إلى المنتج المستهدف بين المنتجات الثانوية، ونفايات الكتلة الحيوية، وانبعاثات ثاني أكسيد الكربون وفقاً للبيانات المنشورة [٢، ٣، ٥، ٨، ١٠، ١٢، ١٩-٢١، ٢٣، ٣٠، ٣٦، ٣٨، ٣٩]. وفيما يتعلق بحمض اللاكتيك، أجريت الحسابات العامة فقط للتقنية المستقبلية؛ لأن البيانات الصناعية لإنتاج حمض اللاكتيك وفقاً للتقنية الحالية كانت متاحة [٤٣].

٢- للتقنيات المستقبلية، تم افتراض العمليات المستمرة فقط وتفترض الحسابات عقدين إلى ثلاثة عقود من البحث والتطوير الناجح (R&D، انظر الجدول رقم ١ ,١٣)، وهو ما يمثل مستوى أعلى ممكن من جدوى التقنية. ولعمليات التخمير المستقبلية، فإننا نفترض عائداً من ٩٠ مول٪ من العائد النظري الأقصى. ويتم تحويل سكر التخمير المتبقي (١٠ مول٪) إلى نفايات الكتلة الحيوية وثاني أكسيد الكربون فقط، مع نسبة كربون مفترضة ٢:١ للعمليات الهوائية و١:١ للعمليات اللاهوائية[٥]. ويعني هذا أن مسارات المنتجات الثانوية يمكن تثبيطها، والتي من المرجح أن تتطلب التعديل الوراثي للكائن الدقيق. استندت تقديرات الإنتاجيات المستقبلية على الخبرة من المصانع كبيرة المستوى المنتجة لحمض الستريك والإيثانول كمثالين لعمليات التخمير الهوائية واللاهوائية المتقدمة. وقدرت مستويات الإنتاجية الأعلى المستقبلية هذه بواسطة الخبراء لتصل إلى ١٠ جم/لتر*ساعة لحمض الستريك[٦] و٥٠ جم/لتر*ساعة للإيثانول[٧]. وكان من المفترض أن تقترب إنتاجية المواد الكيميائية الأخرى من قيم الأفق لحمض الستريك لعملية التخمير الهوائية والإيثانول لعملية التخمير اللاهوائية، وهو ما يمثل مستوى مماثل من الطموح. وتم تقدير تركيزات محلول التخمير المستقبلية للعمليات المستمرة لتكون في حدود قيم نهاية عمليات الدفعة الواحدة الحالية؛ بسبب التفاعلات بين الإنتاجية والتركيز:

- سوف تعتمد التقنية المستقبلية على التخمير المستمر عند نقطة أقصى إنتاجية للكائنات الحية الدقيقة مع إزالة المنتج في الموقع. وتحدث الإنتاجية القصوى للعمليات الحالية عند ما يقرب من نصف التركيز الأقصى للدفعة الواحدة.
- للتقنية المستقبلية، فإن تركيز محلول التخمير الموافق لهذه الإنتاجية القصوى يفترض أن يتم زيادته بعامل ٢، مما يؤدي إلى تركيزات لمحلول التخمير في مستوى تخمير الدفعة الواحدة الحالي. وقد تم استعراض القيم المقترضة لهذه العوامل التقنية بصورةٍ دقيقة بواسطة خبراء من الصناعة والأوساط الأكاديمية [٢٧] وتمثل القدرة التقنية بعد ٢٠-٣٠ سنة من البحث والتطوير. ومع ذلك، ينطوي توقع العوامل التقنية الرئيسة المستقبلية دائماً على عدم اليقين.

---

(٥) يستند هذا التقدير على الحسابات المفصلة لتقسيم الكربون لأربعة عمليات تخمير لاهوائية وأربعة عمليات تخمير هوائية. العمليات الهوائية لديها نسب حوالي ٢:١. يكون الانتشار للعمليات اللاهوائية أكبر بكثير؛ وحيث يجب تكوين ثاني أكسيد الكربون الأيضي أقل من العمليات الهوائية فقد افترضنا نسبة ١:١.

(٦) تم ذكر إنتاجيات تصل إلى ٥ جم/لتر*ساعة [٣٢]، لذلك تبدو الزيادة بعامل ٢ التي ينتج عنها ١٠ جم/لتر*ساعة ممكنة خلال ٢٠-٣٠ سنة.

(٧) ذكر بعض الكتاب [١٧، ٣١] إنتاجيات حتى أعلى من ٥٠ جم/لتر*ساعة، ولكن مع الإنتاجيات الحالية حوالي ٢ جم/لتر*ساعة، فإن الزيادة بعد ٥٠ جم/لتر*ساعة على نطاقٍ صناعي تبدو غير محتملة في غضون ٢٠-٣٠ سنة.

يقدم الجدول رقم (٢, ١٣) لمحة عامة عن أنواع عمليات التجهيز النهائي التي كانت تستخدم لفصل منتجات التخمير[٨]. كانت أنواع عمليات التجهيز النهائي للتقنيات الحالية مستمدة من المراجع.

الجدول رقم (٢, ١٣). أنواع عمليات التجهيز النهائي المستخدمة للفصل في التقنيات الحالية والمستقبلية لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية.

	التقنية الحالية	التقنية المستقبلية
البلورة	السكسينيك [٣٨]، الأدبيبك [٤٦]	السكسينيك، الأدبيبك
التقطير	PDO [٣٦]، الإيثانول [١٠]، ABE [٣٠]	الإيثانول، ABE
الفصل الغشائي الكهربائي	السكسينيك [٤٨]، الخليك [٩]	الأوسينيك، اللاكتيك، الخليك، الأدبيبك
الإنزيمات	PHA [٤٠]	PHA
الاستخلاص	الخليك [٤٧]، PHA [٤٠]	الخليك[١]
التجريد الغازي	ABE [٥]	ABE
التبخير المسبق	الإيثانول [١٨]	PDO، الإيثانول، ABE

[١] لتقنية حمض الخليك المستقبلية، لا يوجد فقط مخططات العملية على الاستخلاص والفصل الغشائي الكهربائي ولكن أيضاً واحدة تجمع بين كلٍ من تقنيات الفصل هذه.

واستندت الافتراضات عن عمليات الفصل التقنية المستقبلية على عدد من الاعتبارات:

- لا يعدُّ الترسيب صالحاً للإنتاج على نطاقٍ واسع؛ لأنه ينطوي على استخدام كميات كبيرة من المواد الكيميائية ويؤدي إلى منتجات ثانوية أقل قيمة مثل الجبس و/ أو مياه الصرف مع أحمال عالية من الملح.
- تم اعتبار الاستخلاص والامتصاص خيارات مستقبلية مقبولة؛ بسبب الاستخدام المحتمل "للمذيبات الخضراء" ذات الآثار البيئية الأقل الواضحة (على سبيل المثال، من حيث التأثيرات المسرطنة والسامة) مقارنةً مع المذيبات الحالية.
- تم أخذ عمليات الغشاء مثل التبخير المسبق، والفصل الغشائي الكهربائي، والترشيح الفائق في الاعتبار؛ بسبب استخدامها المنخفض للطاقة (المتوقع). ومع ذلك، فإن كمية كبيرة من البحث والتطوير سوف تبقى في كثيرٍ من الأحيان ضرورية لوضع عمليات الأغشية هذه قيد الاستخدام على النطاق الصناعي.
- تفترض التقنيات الحالية وكذلك المستقبلية خطوة تبخير واحدة تصل بنسبة الماء إلى المنتج إلى ١:٥ لعمليات التبخير؛ وللنسب الأعلى من الماء، تم افتراض التبخير ثنائي التأثير وتم اعتبار زيادة تكاليف الاستثمار.

(٨) حمض البولي لاكتيك، البولي ثلاثي الميثيلين رباعي الفيثالات، الإيثيلين، والإيثيل لاكتات لا تظهر في الجدول رقم (٢, ١٣) لأنها تنتج من التحويل الكيميائي من أحد منتجات التقنية الحيوية الصناعية المدرجة في هذا الجدول.

openkanal.com

(٤, ١, ٢, ١٣) استخدام الطاقة Energy Use

تم تحديد طاقة العملية للنظام المشمول في النهج العام عن طريق ضرب إنتاجية الكتلة والحجم في استخدام الطاقة النوعية المتوقع لكل خطوة في العملية. وتم تقدير الطاقة النوعية للعملية كما هو موضح في الجدول رقم (٣, ١٣). على أساس المراجع، ثم معايرتها (للوصف المفصل للطريقة نظر [٢٧]).

الجدول رقم (٣, ١٣). البيانات الرئيسة على استخدام الطاقة الخاص لعمليات الوحدات في التخمير والتجهيز النهائي [٢٧].

عمليات الوحدة	الكمية	الوحدة
التخمير		
التعقيم	٠,١٠٠	كجم بخار/ كجم بيئة التخمير
التقليب	٠,٥٠٠	كيلو وات قوة/ م^{٣} حجم التخمير
التقليب والتهوية	٣,٠٠٠	كيلو وات قوة/ م^{٣} حجم التخمير
التجهيز النهائي		
الترشيح الغشائي		
الترشيح الدقيق	٢,٠٠٠	كيلو وات ساعة قوة/ م^{٣} محلول الرشيح
الترشيح الفائق	٥,٠٠٠	كيلو وات ساعة قوة/ م^{٣} محلول الرشيح
الترشيح بأغشية الفصل	٥,٠٠٠	كيلو وات ساعة قوة/ م^{٣} محلول الرشيح
الترشيح النانوي	٧,٠٠٠	كيلو وات ساعة قوة/ م^{٣} محلول الرشيح
الأسموزية العكسية	٩,٠٠٠	كيلو وات ساعة قوة/ م^{٣} محلول الرشيح
الفصل الغشائي الكهربائي	٠,١٠٠	كيلو وات ساعة قوة/ مكافئ
تبخير الماء،	١,٢٠٠	كجم بخار/ كجم متبخر
مرحلة واحدة	٠,٤٠٠	كيلو وات ساعة قوة / كجم متبخر
تبخير الماء،	٠,٥٠٠	كجم بخار/ كجم متبخر
عدة مراحل	٠,٠٠٥	كيلو وات ساعة قوة / كجم متبخر
التقطير	١,٣*حرارة تبخير المنتج	كجم بخار/ كجم متبخر

(٢, ٢, ١٣) منهجية التأثيرات البيئية Environmental Impacts Methodology

نحن نقوم بتحليل الأداء البيئي لإنتاج المواد الكيميائية الضخمة من الكتلة الحيوية باستخدام التقنية الحيوية الصناعية آخذين في الاعتبار التقنية الحالية والمستقبلية (٢٠٣٠) ثم مقارنة النتائج مع تلك لإنتاج البتروكيماويات الضخمة. ونركز بشكلٍ خاص على استخدام المنتجات المختارة كمواد كيميائية ونستبعد استخدامها كوقود وعلف للحيوانات.

obeikandl.com

(١ , ٢ , ٢ , ١٣) حدود النظام System Boundaries

نحن نستنتج من التقييمات البيئية التي أجريت لأنظمة من المهد-إلى- بوابة المصنع ومن المهد-إلى-اللحد في باتل وآخرون [٢٧]. لتقييم الآثار البيئية لهذه المواد الكيميائية، يكون ضرورياً إجراء التقييم عبر دورة الحياة الكاملة للمنتجات (من المهد إلى اللحد) ونحن نقدم بذلك فقط النتائج لهذه الأخيرة. وتم تمييز خمسة نظم فرعية عند نمذجة دورة الحياة (الشكل رقم ٢ , ١٣):

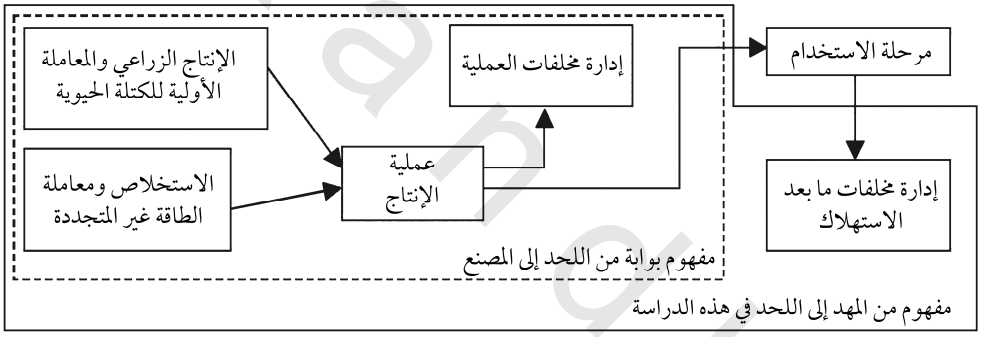
١- استخلاص موارد الطاقة غير المتجددة مثل النفط الخام.

٢- الإنتاج الزراعي والمعالجة المسبقة للكتلة الحيوية.

٣- العملية الحيوية (عملية الإنتاج الفعلي).

٤- إدارة نفايات العملية.

٥- إدارة النفايات بعد المستهلك.



الشكل رقم (٢ , ١٣). الأنظمة الفرعية وحدود النظام التي تعدُّ ضمن التقييم البيئي للكيماويات الحيوية والبتروكيميائية.

تم استبعاد مرحلة الاستخدام؛ لأنها عادةً مطابقة للمنتجات القائمة على العمليات الحيوية والمنتجات القائمة على البتروكيماويات المقارنة (على سبيل المثال، أحد مكونات البلاستيك في سيارات الركاب)؛ وكحجة إضافية، فإن المواد الكيميائية الضخمة عادةً لا تؤدي إلى انبعاثات خلال هذه المرحلة.

(٢ , ٢ , ٢ , ١٣) تخصيص وتوسيع النظام Allocation and System Expansion

يجب اختيار طريقة تسمح بالتعبير عن الأثر البيئي بالنسبة للوحدة الوظيفية المختارة وذلك لكافة العمليات متعددة الوظائف التي تؤدي إلى أكثر من منتجٍ واحد. وطريقتا التخصيص الأكثر استخداماً لهذه الغاية هما توسيع وتقسيم النظام. يعبر توسيع النظام النموذجي عن منتج ثانوي عن طريق توسيع النظام الذي تم تحليله ليشمل

أيضاً إنتاج المنتج الثانوي عن طريق وسائل بديلة. ويغير هذا النهج الوحدة الوظيفية إلى طنٍ واحد من المادة الكيميائية المطلوبة، بالإضافة إلى كمية X من المنتج الثانوي. ومن أجل إجراء توسيع النظام والحد من الوحدة الوظيفية إلى طنٍ واحد من المادة الكيميائية المطلوبة فإننا ندخل أرصدة تمثل التأثيرات المتجنبة المتصلة بتصنيع المنتجات الثانوية (انظر [٤٤]). ويستخدم توسيع النظام عندما يمكن أيضاً إنتاج المنتج الثانوي (على سبيل المثال، الكهرباء من تفل قصب السكر) خلال عملية قائمة بذاتها (على سبيل المثال، الكهرباء من الفحم). من الناحية الأخرى، فإنه لابد من استخدام التقسيم عندما لا توجد مثل عملية الإنتاج هذه، مثل حطب الذرة (الذي يمكن فقط إنتاجه مع الذرة).

ويتم التقسيم في الغالب من خلال تقسيم الأثر البيئي الكلي وفقاً لنسبة الكتلة أو القيمة الاقتصادية للمنتجات. وفي هذه الدراسة كان تخصيص وتوسيع النظام متصلين بإنتاج سكر التخمير، والإنتاج المشترك للمواد والطاقة، والإنتاج المشترك للكثير من المواد الكيميائية في خطوة التخمير. على سبيل المثال، فإن الطاقة الناتجة من حرق نفايات الكتلة الحيوية التي تنشأ من العمليات الحيوية ينتج عنها رصيد طاقة والذي تم خصمه من مدخلات الطاقة غير المتجددة؛ لأن هذه الطاقة تزيح استخدام الطاقة غير المتجددة، على سبيل المثال، الكهرباء من الشبكة. كما تم استخدام توسيع النظام أيضاً للتعامل مع منتجات التخمير الثانوية: تم إضافة جميع المدخلات للتخمير وإدخال أرصدة للمنتجات الثانوية (على سبيل المثال، الأسيتون والإيثانول في حالة ABE). وكانت هذه الأرصدة مساوية لإنتاج هذه المنتجات الثانوية من البتروكيماويات؛ لأن المنتجات الثانوية من التقنية الحيوية الصناعية كان يفترض أن تزيح البتروكيماويات المتطابقة كيميائياً. كما استخدم التقسيم أيضاً في إنتاج سكريات التخمير (انظر القسم ٣,٢,٢,١٣).

(٣,٢,٢,١٣) إنتاج سكر التخمير Production of Fermentable Sugar

تم أخذ ثلاثة أنواع من سكر التخمير للتحليل البيئي في الاعتبار: الجلوكوز من نشا الذرة، والسكروز من قصب السكر، وسكريات التخمير من اللجنوسليولوزات. ويتم إنتاج الجلوكوز ($C_6H_{12}O_6$) من الذرة باستخدام الإنزيمات لتحليل نشا الذرة. وقد أخذت مجموعة البيانات من المراجع [٤١، ٤٢]. وفي حالة الإنتاج الزراعي، تم تقسيم الآثار البيئية بين الذرة وحطب الذرة المزال من الحقل من خلال تخصيص اقتصادي باستخدام نسبة سعر من ١:٤ للذرة مقارنةً بالحطب. وتم افتراض أن سكريات التخمير من نشا الذرة تنشأ من طاحونة رطبة حديثة للذرة بواسطة التحليل المائي للنشا إلى سكر العنب. وقد اعتمدنا على تخصيص منتج ثانوي مفصل قائم على الكتلة (انظر أيضاً [٤٢]) والذي أخذ في الاعتبار العمليات الفرعية التي كانت مطلوبة للمنتجات الثانوية لسكر التخمير من الذرة. وبعد حساب المنتجات الثانوية يكون الإدخال الصافي هو ١,٠٦ كجم من الذرة الجافة لـ ١ كجم من الجلوكوز.

ينتج عن طحن قصب السكر السكروز ($C_{12}H_{22}O_{11}$) وتفل قصب السكر. وتم حساب مجموعة البيانات من المراجع [٦، ٢٢]. يتم حرق التفل لتوليد الطاقة؛ لأنه منتج منخفض القيمة ذو استخدام محدود. ولذلك، فقد استخدمنا مدخل المصنع الإجمالي من قصب السكر كنقطة البداية في التخصيص الافتراضي والأرصدة المعتمدة للطاقة المنتجة من تفل قصب السكر. وبهذا هناك حاجة لـ ٨,٧ كجم من قصب السكر الرطب لإنتاج ١ كجم من السكروز.

سكريات التخمير من الكتلة الحيوية الخشبية، التي يشار إليها أيضاً بسكريات C5/C6، هي عادةً مزيج من الجلوكوز، والزيلوز، وكميات أقل من السكريات الأخرى التي يتم الحصول عليها خلال تحليل السليولوز والهيميسيليولوز. وقد افترضنا إنتاج سكريات C5/C6 من حطب الذرة واستخلصنا مجموعة البيانات من المرجع [١]. ولذلك كان الغرض الرئيس من زراعة الذرة وسوف يبقي هو إنتاج النشا من حبوب الذرة. الحالة الافتراضية لتخصيص المدخلات للإنتاج الزراعي لحطب الذرة هي تخصيص اقتصادي باستخدام نسبة سعر ١:٤ للذرة مقارنةً بالحطب. ويتطلب إنتاج طن واحد من سكر التخمير ١,٧٩ طن من حطب الذرة.

(١٣,٢,٢,٤) جرد دورة الحياة Life Cycle Inventory

يتميز كل مدخل ومخرج من العمليات المنمذجة بقيمته لتوليد الحرارة (HHV في جيجا جول/ طن)، واستخدام الطاقة التراكمي لإنتاجه، والكربون المجسم له، وانبعاثات المدخلات لغازات الاحتباس الحراري التراكمية (GHG)، واستخدام الأراضي اللازمة للإنتاج الزراعي. وتمثل بيانات البتروكيماويات المستخدمة كمواد مساعدة التقنية الحالية وتنبع من الصناعة [٣٧] ومن حساباتنا الخاصة اعتماداً على المرجع [٢٨]. واستخدمت مجموعات البيانات هذه بعد ذلك لحساب انبعاثات غازات الاحتباس الحراري التراكمية، والطاقة غير المتجددة، واستخدام الأراضي عن طريق إضافة البيانات ذات الصلة لجميع مدخلات العملية.

(١٣,٢,٢,٥) المؤشرات البيئية Environmental Indicators

يتضمن التقييم الكامل لدورة الحياة (LCA) حساب مجموعة من الآثار البيئية، من بينها التحمض، وزيادة المواد الغذائية، وانبعاثات الجسيمات، والسمية الإنسان، وسمية البيئة. ومع ذلك، فإن الدراسة المقدمة هنا هي تقييم بيئي محتمل يتعامل مع طرق المعالجة المستقبلية وتستخدم لذلك تفويضات للأثر البيئي العام: قد يصبح استخدام الطاقة غير المتجددة (NREU)، وانبعاثات غازات الاحتباس الحراري، واستخدام الأراضي (LU)؛ والطاقة والأرض مصادر شحيحة. وحسبنا استخدام الطاقة غير المتجددة، وانبعاثات غازات الاحتباس الحراري، واستخدام الأراضي لجميع منتجات التقنية الحيوية الصناعية. وتعد هذه المؤشرات هي تفويضات جيدة للأثر البيئي العام.

يمثل استخدام الطاقة غير المتجددة نهجاً واضحاً وعملياً؛ لأن الكثير من الآثار البيئية مرتبطة باستخدام الطاقة [١٣]. يشمل استخدام الطاقة غير المتجددة الطاقة الحفرية والنووية وتم التعبير عنها بقيمة التسخين الأعلى (HHV)، وتدعى أيضاً قيمة توليد الحرارة الإجمالية. وتمشياً من منهجية LCA، فإن قيم NREU المذكورة هنا تمثل الطلب على الطاقة التراكمية لنظام من المهد إلى اللحد.

وتعد انبعاثات غازات الاحتباس الحراري ذات أهمية متزايدة؛ بسبب زيادة الاهتمام في تأثير ظاهرة الاحتباس الحراري في ساحة السياسة، بواسطة الشركات، وبواسطة الجمهور. تم حساب انبعاثات غازات الاحتباس الحراري بمكافئات ثاني أكسيد الكربون وتتكون من انبعاثات غازات الاحتباس الحراري من النظام في شكل ثاني أكسيد الكربون أو غاز الميثان وكذلك أكسيد النيتروز (N_2O) من استخدام الأسمدة في إنتاج الكتلة الحيوية. وتم استبعاد انبعاثات ثاني أكسيد الكربون من الكربون المتجدد المستخرج من الغلاف الجوي خلال نمو النباتات.

يشير استخدام الأراضي إلى استخدام الأراضي الزراعية فقط، وسوف يكون ذو أهمية متزايدة في المستقبل؛ بسبب نمو الاحتياجات من الأراضي للطاقة القائمة على المصادر الحيوية، والوقود الحيوي السائل، والمواد الكيميائية القائمة على المصادر الحيوية، وإنتاج الغذاء والأعلاف. وقد أهملنا احتياجات الأراضي للمنشآت الصناعية، والبنية التحتية للمواصلات، ولإدارة النفايات؛ لأنها صغيرة بالمقارنة مع استخدام الأراضي الزراعية وقابلة للمقارنة مع المنتجات القائمة على المصادر الحيوية والبتروكيماويات.

(١٣, ٢, ٣) اقتصاديات العملية Process Economics

تم إجراء التحليل الاقتصادي للمواد الكيميائية في التقنية الحيوية الصناعية بقدرة منشأة ١٠٠ كيلو طن/ سنة، والذي كان حلاً وسطاً في ضوء مقياس الاقتصاد من ناحية، وتكاليف النقل للمصادر الأولية الحيوية من الناحية الأخرى. وقد اعتبر هذا المقياس ممثلاً لمنشأة تقنية حيوية صناعية، ولكن تصبح نطاقات أوسع ممكنة أيضاً وتم إجراء تحليل الحساسية لتقييم تأثير حجم المصنع على الجدوى الاقتصادية. وتم حساب عمليات البتروكيماويات حسب أحجام المصانع الحالية، والتي يمكن أن تكون أكبر من ١٠٠ كيلوطن بشكلٍ واضح، اعتماداً على المنتج.

واستندت جميع حسابات التكلفة على الاستثمارات لبناء مصنع جديد في أوروبا الغربية، مع الحسابات التي أجريت باليورو في عام ٢٠٠٠م. تم تقدير الاستثمار (رأس المال الثابت الكلي، TFC) ومتطلبات العمل من قبل شركة DSM عن طريق تطبيق ما يسمونه أسلوب الوحدة الوظيفية [٣٥]. تم إجراء هذه الحسابات لكل مسار عام للتقنية الحيوية الصناعية القائمة على مخطط سير عملية المنتج الفردي، وميزان الكتلة والطاقة (انظر [٢٧] للأرقام

الفردية). وقد استخدمنا أسعار السوق لمخزونات البتروكيماويات والمواد المساعدة، وتم تعيين أسعار سكر التخمير خارجياً (انظر القسم ١, ٢, ٣, ١). وتتماشي إجراءات التقييم الاقتصادي (انظر الشكل رقم ١٣, ٣) مع اقتصاديات الأعمال القياسية: أولاً، تم إضافة التكاليف المتغيرة (المواد الأولية، والمواد المساعدة/ المحفزات، والمنتجات الثانوية، والمرافق، ومعالجة النفايات) والتكاليف الثابتة (المستلزمات والعمالة) للحصول على إجمالي تكاليف التشغيل المباشرة. ثانياً، تم إضافة الضرائب ورسوم التأمين، والنفقات العامة لهذا الرقم فضلاً عن بدل للتسويق والإدارة والبحث والتطوير. وأخيراً، تم إضافة ما يسمى رسوم رأس المال، وهو ما يمثل مجموع الاستهلاك والأرباح. وكانت النتيجة النهائية هي تكلفة الإنتاج مضافاً إليها الأرباح (PCPP؛ المعروفة أيضاً بتكلفة الإنتاج) التي هي تفويض لسعر السوق. تم حساب رسوم رأس المال عن طريق ضرب رأس المال الثابت الكلي مع نسبة مئوية ثابتة. بالتشاور مع خبراء الصناعة، تم استخدام رسوم رأس مال بحوالي ٣٠٪، وهو ما يمثل احتمال جزئياً. ولم تدرج ضريبة القيمة المضافة في الحسابات.



الشكل رقم (١٣, ٣). طريقة حساب تكاليف الإنتاج مضافاً إليها الأرباح (PCPP).

ويعدُّ منتج التقنية الحيوية الصناعية مجدياً من الناحية الاقتصادية إذا كان الـ PCPP له أقل من سعر السوق أو الـ PCPP لنظيره من البتروكيماويات. وقد يكون سعر السوق الحقيقي لمنتج التقنية الحيوية الصناعية أعلى أو أقل من الـ PCPP له اعتماداً على العرض والطلب:

● عادةً ما تكون الـ PCPP لمنتج التقنية الحيوية الصناعية أقل بكثير من سعر السوق إذا كان منتج التقنية الحيوية الصناعية جديداً على السوق وإذا تم استخدامه في تطبيقاتٍ متخصصة. والأسباب المحتملة هي أن الربح المصنوع يكون أعلى، والقدرة الحقيقية لمرافق الإنتاج أقل من ١٠٠ كيلو طن/ سنة بشكلٍ واضح، لم يتم تحسين العملية و/ أو لا يمكن ضمان التشغيل المستمر.

● يمكن أيضاً أن تكون الـ PCPP لمنتج التقنية الحيوية الصناعية أعلى من سعر السوق. هذه هي الحالة خاصةً إذا كان منتج التقنية الحيوية الصناعية متطابقاً من الناحية الكيميائية مع منتج بتروكيميائي والذي يتم إنتاجه منذ عقود خلال طريق إنتاج مؤكد. ويمكن لمثل عمليات البتروكيماويات هذه أن تكون متفوقة اقتصادياً؛ بسبب المزايا الاقتصادية للنطاق و/ أو الإنتاج في المصانع منخفضة القيمة.

(١, ٣, ٢, ١٣) أسعار سكريات التخمير Prices of Fermentable Sugars

كان سكر التخمير هو المادة الخام لعمليات التقنية الحيوية الصناعية ويتأثر سعره باقتصاديات منتجات التقنية الحيوية الصناعية. يمكن أن يكون سكر التخمير خام أو منقى ويتكون من الكربوهيدرات سهلة التخمر المستمدة من الكتلة الحيوية مثل السكروز، أو أنواع النشا المحللة أو اللجنوسليولوز الذي تمت معاملته وتحليله سابقاً، والتي لا تزال تقنية ناشئة. ومن أجل تمثيل الاختلافات في أسعار السكر في كلٍ من المستقبل القريب والبعيد بالنسبة لمناطق العالم، فقد أجريت الحسابات لمستويات أربعة أسعار لسكر التخمير. أقل الأسعار ٧٠ يورو/ طن يمثل أسعار السكر المحلية في البرازيل[٩]: بسبب الظروف المناخية الجيدة وتوافر العمالة الرخيصة جداً، فإن تكلفة إنتاج سكر التخمير من قصب السكر كانت في حدودها الدنيا. وارتفاع سعر السكر إلى ٢٠٠ يور/ طن يمثل متوسط ١٠ أعوام للسكر الخام العالمي (عقد ١١) كما تم تداوله في مجلس نيويورك للتجارة [٢٤]. وتم اختيار سعر متوسط عند ١٣٤ يورو/ طن. ويمثل المستوى الأقصى عند ٤٠٠ يورو/ طن متوسط ١٠ أعوام للسكر الخام في الولايات المتحدة (عقد ١٤) كما تم تداوله في مجلس نيويورك للتجارة [٢٥][١٠].

---

(٩) على أساس متوسط سعر السكر ٢٥٠ ريال برازيلي لموسم ٢٠٠٣/ ٢٠٠٤م [٢٦] وسعر صرف ريال برازيلي = ٠,٢٩ يورو في نفس الوقت.

(١٠) تستند مستويات الأسعار هذه على أسعار السكر الخام. ومع ذلك، إذا كانت الكائنات الحية الدقيقة حساسة للشوائب فإنه سوف يتم استخدام السكر المنقى للتخمير. ويتم تداول السكر المنقى العالمي في بورصة لندن بمتوسط سعر حوالي ٢٥٠ يورو/ طن خلال العشر سنوات الماضية [٣٣] وبالتالي ضمن نطاق الأسعار التي أخذت في الاعتبار.

وتم إدخال مستويات الأسعار لطن سكر التخمير كمدخلات خارجية في حساباتنا، أي، نحن لا نقوم بالتحليلات الاقتصادية للمجموعات المختلفة من أنواع المصادر الأولية مع التقنيات لإنتاج سكر التخمير.

(١٣,٢,٣,٢) أسعار المرافق والمواد المساعدة Prices of Utilities and Auxiliaries

في التقييم الاقتصادي نفترض سعر النفط الخام لسوق أسهم افتراضي بـ٧٠ دولاراً أمريكياً للبرميل الواحد (١٢ يورو/ جيجا جول) وسعر الغاز الطبيعي بـ ٨,٥ يورو/ جيجا جول. ويتوافق هذا مع سعر كهرباء تقديري بـ ١٧ يورو/ جيجا جول[كهرباء] وسعر بخار بـ ٢٥ يورو/ طن (١١,٩ يورو/ جيجا جول). ويتم إدخال أرصدة اقتصادية من أجل حساب الإنتاج المتجنب للحرارة والطاقة إذا تم استرجاع الطاقة. وتم افتراض أن أسعار الإنزيم والغشاء سوف تنخفض في المستقبل؛ بسبب حجم إنتاجها الكبير. وتم تحديد أسعار الإنزيمات للتقنية الحالية بـ ١٠٠ يورو/ كجم، وتم افتراض أنها سوف تنخفض بمعامل ١٠ للتقنية المستقبلية؛ وتحديد أسعار الأغشية عالية الجودة بـ ١٠٠ يورو/ طن من المنتج مع افتراض انخفاضها بواقع معامل ٢.

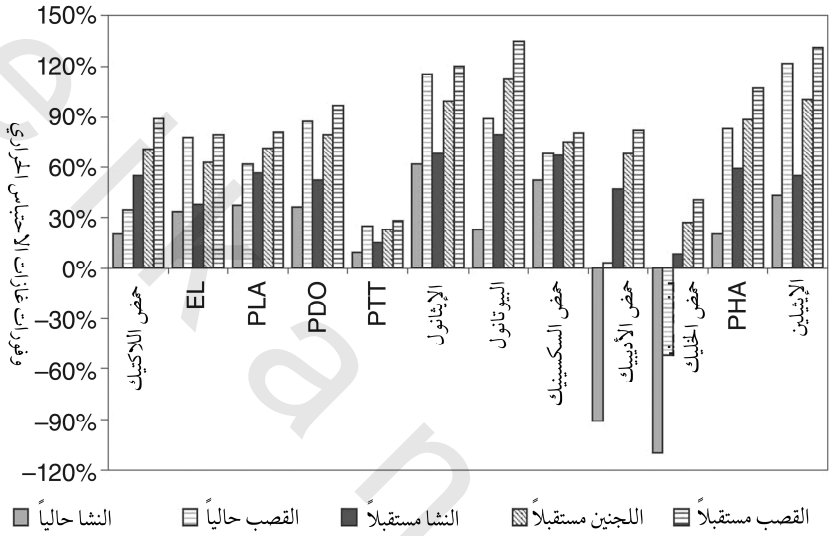
(١٣,٣) النتائج العامة Overall Results

(١٣,٣,١) نتائج التحليل البيئي Results of Environmental Analysis

تعتمد الآثار البيئية للعمليات التي تمت داستها إلى حدٍ كبير على الإنتاجيات، والعائدات، والتركيزات التي تم افتراضها لمرحلة التخمير [٢٧]. من أجل تقييم إمكانية التقنية الحيوية الصناعية طويلة المدى، فإننا نختار قيم مستقبلية من المتوقع أن يتم التوصل إليها بعد ٢٠-٣٠ سنة من البحث والتطوير الناجحين (قيم الأفق). ونقدم في هذا البحث فقط نتائج انبعاثات غازات الاحتباس الحراري، ولكن تظهر نتائج الـ NREU النمط نفسه (انظر [٢٧]). يظهر الشكل رقم (١٣,٤) تحليل المنتجات تباعاً لمتوسط وفورات غازات الاحتباس الحراري في منتجات التقنية الحيوية الصناعية مقارنةً مع مكافئاتها البتروكيماوية. يمثل كل شريط في الشكل رقم (١٣,٤) المتوسط الحسابي خلال عدة طرق إنتاج في التقنية الحيوية الصناعية لنفس المادة الكيميائية. يظهر الشكل رقم (١٣,٤) أن المنتجات ذات أعلى وفورات نسبية هي الإيثانول، والبيوتانول، والإثيلين، بينما حمض الخليك والـ PTT كان لها أقل وفورات. وكانت الاختلافات بين أفضل الحالات والمتوسطات الحسابية ٧-٢٠٪ في وفورات غازات الاحتباس الحراري. يبين الشكل رقم (١٣,٤) أن جميع المنتجات تقريباً واعدة لوفورات غازات الاحتباس الحراري في التقنية الحالية.

بالنسبة للـ PHA وحمض الأدييك يعتمد هذا على مصدر سكر التخمير. ولا يقدم حمض الخليك أي وفورات باستخدام التقنية الحالية؛ بسبب انخفاض تركيز محلول البيئة وانخفاض الإنتاجية في التخمير، فضلاً عن

ارتفاع استخدام المرافق في التجهيز النهائي؛ بسبب صعوبة فصل حمض الخليك من المياه (خليط ازوتروبي). وتكون وفورات غازات الاحتباس الحراري منخفضة في حالة الـ PTT لأن هذا البوليمر مصنوع من الـ PDO وحمض التيرفثاليك المنقى، وينتج هذا الأخير من مواد البتروكيماويات الأولية. تكون وفورات غازات الاحتباس الحراري لقصب السكر كمصدر لسكر التخمير هي أعلى بشكلٍ واضح من نشا الذرة؛ بسبب الإنتاج الثانوي لكميات هائلة من الكهرباء التي يمكن تصديرها (انظر القسم ٣,٢,٢,١٣).



الشكل رقم (٤,١٣). وفورات انبعاثات غازات الاحتباس الحراري (GHG) لكل طن من كيماويات التقنية الحيوية الصناعية مقارنةً مع نظرائها البتروكيماوية للتقنية الحالية والمستقبلية، نظام من المهد إلى اللحد. EL، لاكتات الإيثيل؛ PLA، حمض البولي لاكتيك؛ PDO، ١،٣-بروبان دايول ؛ PTT ، البولي ثلاثي الميثيلين رباعي الفثالات؛ PHA، البولي هيدروكسي ألكانوات.

يظهر الشكل رقم (٤,١٣) أنه من أجل تعظيم التوفير في انبعاثات غازات الاحتباس الحراري لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية فإن قصب السكر يكون مفضلاً عن المواد اللجنوسليولوزية، والتي بدورها أفضل من نشا الذرة كمصدر لسكر التخمير. وفي المناخات المعتدلة مثل أوروبا وأمريكا الشمالية حيث لا يتوفر قصب السكر من الإنتاج المحلي، ينبغي أن تكون المواد اللجنوسليولوزية هي المصادر الأولية المفضلة في المستقبل.

وتكون الوفورات في بعض كيماويات التقنية الحيوية الصناعية المصنوعة من المواد اللجنوسليولوزية وقصب السكر أكبر من ١٠٠٪ (الشكل رقم ٤,١٣)؛ لأن أرصدة الطاقة من الاحتراق الثانوي لنفايات الكتلة الحيوية أو من النفايات الثانوية للإنتاج الزراعي كانت أكبر من الـ NREU لسلسلة عملية التقنية الحيوية الصناعية. وفي المتوسط، فإن وفورات غازات الاحتباس الحراري للتقنية المستقبلية في التقنية الحيوية الصناعية تكون أعلى بـ ٢٥-

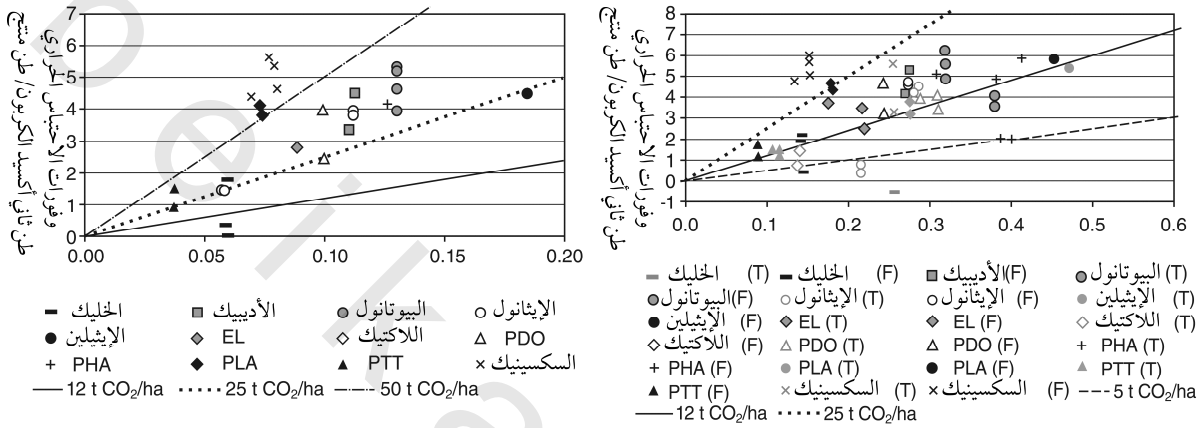
٣٥٪ من التقنية الحالية للتقنية الحيوية الصناعية. يبين هذا أن التقدم التقني يمكن أن يزيد من تعزيز الميزة البيئية لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية على مكافئاتها البتروكيماوية.

وقد يرجع انخفاض انبعاثات غازات الاحتباس الحراري إلى (أ) العائد العالي من التخمير أو (ب) العائد المنخفض من التخمير جنباً إلى جنبٍ مع أرصدة الطاقة الكبيرة من الاحتراق اللاحق للكتلة الحيوية المنتجة ثانوياً. في الحالية الثانية، تتطلب عمليات التخمير غير الفعالة المزيد من الأراضي بشكلٍ كبير لإنتاج الكتلة الحيوية مما تحتاجه التخميرات الفعالة. وإذا أصبح توافر الأراضي محدوداً، فإنه ينبغي تعظيم وفورات غازات الاحتباس الحراري لكمية معينة من الأرض، أو بدلاً من ذلك، ينبغي تقليل استخدام الأراضي لكمية معينة من غازات الاحتباس الحراري ليتم حفظها. وبذلك يحلل الشكل رقم (٥ ,١٣) وفورات غازات الاحتباس الحراري في وقتٍ واحد في جميع طرق التقنية الحيوية الصناعية نسبةً إلى الطريقة البتروكيماوية واستخدام الأراضي بالنسبة للطن الواحد من المواد الكيميائية.

يبين الشكل رقم (٥ ,١٣) أنه توجد علاقة بين نوع المادة الكيميائية وكمية الأراضي المستخدمة لإنتاجها من قصب السكر. لإنتاج طن واحد من حمض كربوكسيلي فإن هناك حاجة لـ ١ ,٠-٢ ,٠ هكتار من الأراضي، في حين أن الكحولات تكون في المدى ٢٥ ,٠-٣٥ ,٠ هكتار/ طن. وبالنسبة للـ PTT، يكون استخدام الأراضي ووفورات غازات الاحتباس الحراري منخفضاً لأنه يتم فقط إنتاج جزء من هذا البوليمر من المواد الأولية القائمة على المصادر الحيوية. وعند وضع وفورات غازات الاحتباس الحراري وانخفاض الأراضي المستخدمة في المقام الأول، فإن حمض السكسينيك، والـ PLA تكون هي الأكثر جاذبية. وتتماشي نتائجنا مع البيانات من الأبحاث المنشورة على المنتجات الفردية بشكلٍ جيد [٢، ٤، ١٤، ١٥، ٣٤، ٤٣] عند أخذ فروق التخصيص في الاعتبار. ينتج عن إنتاج وقود الإيثانول من قصب السكر وفورات ١٠-١٦ طن مكافئ من ثاني أكسيد الكربون/ هكتار [٢٧]. وتظهر الكثير من كيماويات التقنية الحيوية الصناعية وفورات ثاني أكسيد الكربون في الهكتار الواحد أعلى من ١٦ طن مكافئ من ثاني أكسيد الكربون لذلك هي الأفضل من وجهة نظر التخفيف من ثاني أكسيد الكربون.

يظهر الشكل رقم (٥ ,١٣) فقط التقنية المستقبلية للمواد اللجنوسليولوزية؛ لأن الإنتاج التجاري لسكريات التخمير من المواد اللجنوسليولوزية ليس ممكناً بعد على نطاقٍ واسع. وتظهر مقارنة أرقام لقصب السكر والمواد اللجنوسليولوزية في الشكل رقم (٥ ,١٣) أن استخدام الأراضي يكون أفضل بكثير من حيث وفورات ثاني أكسيد الكربون في الهكتار الواحد بالنسبة لحطب الذرة من قصب السكر. ينتج عن تحويل حطب الذرة للمواد الكيميائية باستخدام التقنية المستقبلية دائماً وفورات ثاني أكسيد الكربون تقريباً أعلى من ٢٥ طن/ هكتار. وتوفر الكتلة الحيوية لاستخدام الكهرباء حوالي ١٢ طن مكافئ من ثاني أكسيد الكربون/ هكتار بالنسبة لمحصول القمح

بأكمله [٧] ويوفر استخدام المواد اللجنوسليولوزية في إنتاج وقود الإيثانول ٢–٧ طن مكافئ من ثاني أكسيد الكربون/ هكتار [٢٩][١١]. وعند وضع وفورات ثاني أكسيد الكربون في المقام الأول، يعني هذا أن معظم المواد الكيميائية يتم تفضيلها على الطاقة الحيوية في حالة استخدام قصب السكر كمادة أولية، ويتم تفضيل جميع المواد الكيميائية تقريباً في حالة استخدام حطب الذرة.



الشكل رقم (٥ ,١٣). وفورات غازات الاحتباس الحراري (GHG) مقابل استخدام الأراضي للطن الواحد من الكيماويات للنظام من المهد إلى اللحد. سكر التخمير من المواد اللجنوسليولوزية، التقنية المستقبلية (إلى اليسار) وقصب السكر، والتقنية الحالية (T) والمستقبلية (F) (إلى اليمين). الخطوط مستقيمة هي خطوط أيزو تمثل وفورات ثاني أكسيد الكربون لكل هكتار.

يحدد الجدول رقم (٤ ,١٣) كمية وفورات غازات الاحتباس الحراري المحتملة بافتراض الإحلال الكامل لمكافئات البتروكيماويات ويعتمد على الطاقات الإنتاجية العالمية في السنوات ١٩٩٩/ ٢٠٠٠م [٤٥]. وتتجاهل إمكانية الوفورات الإجمالية للمستقبل نمو الصناعة الكيميائية وفقاً للجدول رقم (٤ ,١٣) (٤٨٥ ميجا طن مكافئ من ثاني أكسيد الكربون لنشا الذرة). والوفورات المستقبلية المحتملة تكون أعلى من ذلك إذا تم استخدام المواد اللجنوسليولوزية (٧٨٧ ميجا طن مكافئ من ثاني أكسيد) أو قصب السكر (٩٩١ ميجا طن مكافئ من ثاني أكسيد) كمصادر أولية. وللمقارنة، فإن انبعاثات غازات الاحتباس الحراري من إنتاج التقنية الحالية من مكافئات البتروكيماويات يؤدي إلى ٨٤٣ ميجا طن مكافئ من ثاني أكسيد لنفس القدرة المثبتة وحدود النظام. ويدل هذا على أن الوفورات المحتملة لغازات الاحتباس الحراري للتقنية الحالية ونشا الذرة كمصدر أولي تصل بالفعل إلى ٤٥٪.

(١١) وفورات غازات الاحتباس الحراري من الإيثانول هنا هي حوالي ٣٣ طن مكافئ من ثاني أكسيد الكربون بسبب نظام المرجع: يحل الإيثانول الكيميائي محل الإيثانول المنتج عن طريق الإيثيلين، في حين أن وقود الإيثانول يحل محل البنزين.

الجدول رقم (٤ ,١٣). الإنتاج السنوي المحتمل في جميع أنحاء العالم وأفضل حالة توفير في غازات الاحتباس الحراري لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية الـ ١٥، باستخدام نشا الذرة كمادة أولية، نظام من المهد إلى اللحد.

المنتج		توفير غازات الاحتباس الحراري	مركبة	سنوية
			الطاقة العالمية [٤٨]	توفير غازات الاحتباس الحراري
		(طن ثاني أكسيد الكربون/ طن)	(قيراط/ سنة)	(قيراط ثاني أكسيد الكربون/ سنة)
حمض الخليك	حالياً	-٢ ,٤	٨٣٠٠	غير متاحة
	مستقبلياً	١ ,٢		٩٥٧٠
حمض الأديبيك	حالياً	-٥ ,٢	٢٤٠٠	غير متاحة
	مستقبلياً	٣ ,٣		٧٨٨٠
البيوتانول	حالياً	١ ,٢	٢٤٦٠	٣٠٤٠
	مستقبلياً	٣ ,٩		٩٦١٠
الإيثانول[أ]	حالياً	٢ ,٧	٢٦٠٠	٦٩٧٠
	مستقبلياً	٢ ,٧		٧٠٨٠
الإيثيل أسيتات	حالياً	١ ,٣	١٢٠٠	١٥٨٠
	مستقبلياً	١ ,٩	إيثيل أسيتات	٢٢٢٠
الإيثيلين	حالياً	١ ,٩	١٠٠٠٠٠	١٩١٠٥٠
	مستقبلياً	٢ ,٥		٢٤٥٧١٠
حمض السكسينيك	حالياً	٤ ,٥	١٣٥٠	٦٠٧٠
	مستقبلياً	٥ ,٠	أنهيدريد الماليك	٦٧٨٠
١،٣-بروبان دايول	حالياً	١ ,٨	لاتوجد بيانات	غير متاحة
	مستقبلياً	٢ ,٩		غير متاحة
بولي هيدروكسي الكالونات	حالياً	٢ ,٩	٥٧٠٠٠	١٦٢٧٣٠
	مستقبلياً	٢ ,٨	بولي إيثيلين	١٥٩٦٤٠
حمض البولي لاكتيك	حالياً	٢ ,٣	١١١٠٠	٢٥١٥٠
	مستقبلياً	٣ ,٣	PET	٣٦٥٠٠
الإجمالي	حالياً			٣٩٦٦٠٠
	مستقبلياً			٤٨٥٠٠٠

[أ] نحن ننظر فقط للقدرة المركبة لإنتاج الإيثانول من البتروكيماويات حيث إن الإيثانول الحيوي غالباً ما يستخدم كوقود، في حين أن الإيثانول المستخدم في الصناعة الكيميائية غالباً ينبع من عمليات الإنتاج البتروكيماوية.

obeikandl.com

(١٣,٣,٢) نتائج التحليل الاقتصادي Results of Economic Analysis

تم حساب تكاليف الإنتاج بالإضافة إلى الأرباح (PCPPs) لجميع منتجات التقنية الحيوية الصناعية باستخدام الطريقة الموصوفة أعلاه (انظر الشكل رقم ١٣,٣). يظهر الجدول رقم (١٣,٥) النتائج للنهج العام. وتشير PCPPs البتروكيماويات في الجدول رقم (١٣,٥) إلى المواد القياسية المتطابقة كيميائياً مع المركبات القائمة على المصادر الحيوية، ما لم يرد خلاف ذلك. في حالة حمض اللاكتيك، لايمكن إعطاء مقياس بتروكيماوي لأنه ينتج بالفعل من المصادر الأولية المعتمدة على المصادر الحيوية من التقنية الحيوية الصناعية حالياً، ولذلك تمت المقارنة مع الممارسة الصناعية الحالية. يبين الجدول رقم (١٣,٥) أنه بالنسبة للتقنية الحالية، فإن ثلثين من منتجات التقنية الحيوية الصناعية تكون مجدية اقتصادياً لانخفاض أسعار السكر. الـ PDO، والـ PTT، والـ PLA، وحمض السكسينيك، ولاكتات الإيثيل، والإيثانول هي مجدية اقتصادياً حتى بالنسبة لأسعار السكر العالية جداً (٤٠٠ يورو/ طن).

تتضح هذه النتائج مباشرةً من الشكل رقم (١٣,٦)، الذي يظهر نسبة الـ PCPPs لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية الحالية مقارنةً مع نظرائها من البتروكيماويات. تشير القيم الأقل من ١٠٠٪ إلى أن تكاليف الإنتاج تكون أقل لمنتج التقنية الحيوية الصناعية، في حين تمثل القيم الأعلى من ١٠٠٪ الحالات التي يكون فيها إنتاج منتج التقنية الحيوية الصناعية أكثر تكلفة من نظيره في البتروكيماويات. وتتراوح نسبة الـ PCPP لحمض الخليك من ٥٠٠٪ إلى ٦٣٠٪، وتقع بالتالي خارج مدى الشكل رقم (١٣,٦). وعن طريق القياس، يبين الشكل رقم (١٣,٧) نسب الـPCPP لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية المستقبلية إلى البتروكيماويات (التقنية الحالية). وتقدم تقريباً جميع المنتجات التي تم بحثها وفورات اقتصادية لسعر السكر من ٧٠ يورو/ طن، باستثناء حمض الخليك.

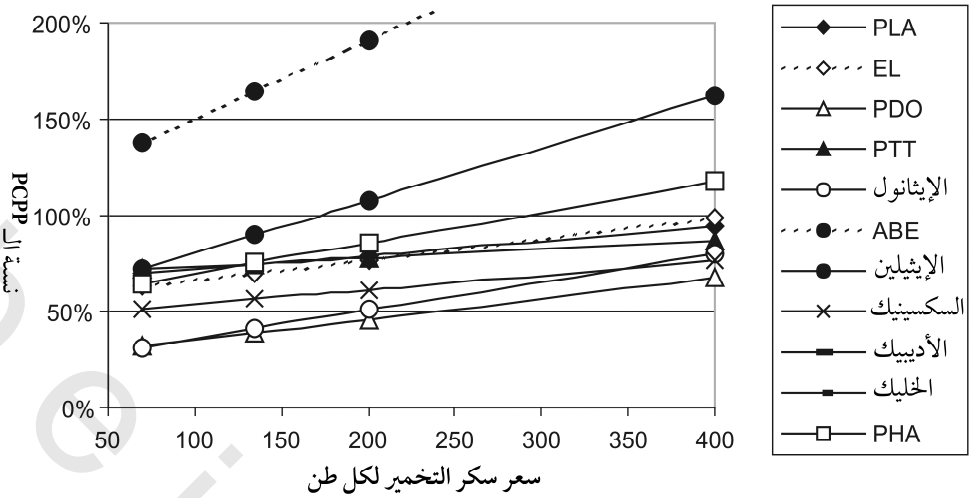
في الختام، يمكن للتقدم التقني أن يساهم بشكلٍ فعال في تحسين الجدوى الاقتصادية لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية: تكون الـ PCPPs للمنتجات التي يمكن الحصول عليها مباشرة من التخمير (على سبيل المثال، حمض اللاكتيك) خلال جميع أسعار السكر أقل من التقنية الحالية بـ٢٠-٤٠٪؛ لا يزال التقدم التقني في خطوة التخمير يقلل الـ PCPP تقريباً بنسبة ١٥-٢٠٪ للمنتجات التي تتطلب تحويلاً كيميائياً بعد التخمير (على سبيل المثال، PLA). وتصبح هذه النتائج في كثيرٍ من المنتجات مجدية اقتصادياً في المستقبل، حتى على أسعار عالية نوعاً ما للسكر. ويلخص الجدول رقم (١٣,٦) جدوى كيماويات التقنية الحيوية الصناعية الحالية والمستقبلية لأربعة أسعار من السكر.

الجدول رقم (٥, ١٣). تكلفة الإنتاج بالإضافة إلى الأرباح (يورو/ طن) لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية لأسعار السكر المختلفة والتقنية الحالية والمستقبلية وفقاً للنهج العام ومؤشر البتروكيماويات (لـ٧٠ دولار أمريكي/ برميل نفط خام).

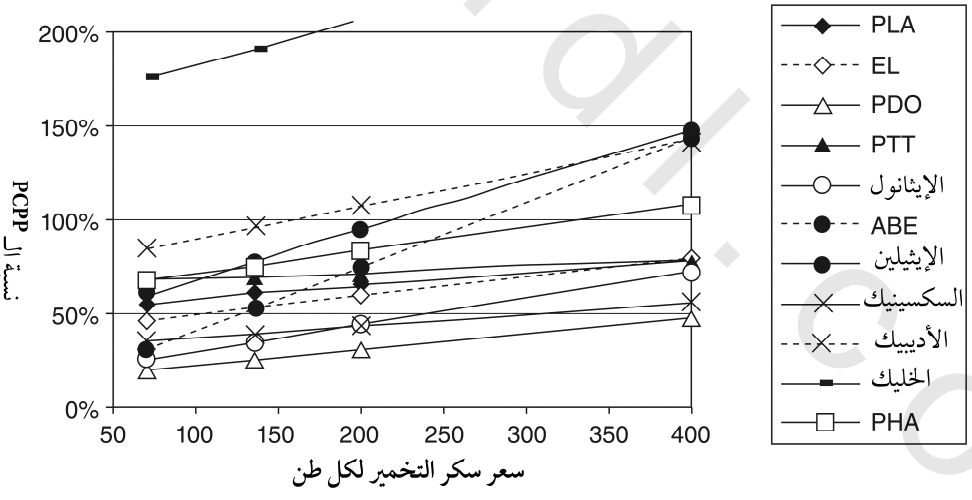
تكلفة الإنتاج بالإضافة إلى الأرباح (يورو/ طن)						
المنتج	التقنية	أسعار سكر التخمير، اعتماداً على المصادر الحيوية				البتروكيماويات
		٧٠ يورو/ طن	١٣٥ يورو/ طن	٢٠٠ يورو/ طن	٤٠٠ يورو/ طن	
ABE	حالياً	١٠٧٠	١٢٧٠	١٤٨٠	٢١١٠	٧٨٠
	مستقبلياً	٢٤٠	٤١٠	٥٨٠	١١١٠	إن-بيوتانول
حمض الخليك	حالياً	٢٥١٠	٢٦٥٠	٢٧٩٠	٣٢٢٠	٥١٠
	مستقبلياً	٩٠٠	٩٨٠	١٠٦٠	١٣٠٠	
حمض الأديبيك	حالياً	٢٩٢٠	٣٣٢٠	٣٧٢٠	٤٩٤٠	١٣٢٠
	مستقبلياً	١١٣٠	١٢٨٠	١٤٣٠	١٨٨٠	
الإيثانول	حالياً	٥٢٠	٦٧٠	٨٢٠	١٣٠٠	١٦٣٠
	مستقبلياً	٤٢٠	٥٧٠	٧٢٠	١١٧٠	
حمض اللاكتيك	حالياً[أ]	٨٥٠	٩٣٠	١٠١٠	١٢٦٠	–
	مستقبلياً	٥٢٠	٦٠٠	٦٨٠	٩١٠	
PDO	حالياً	٧٤٠	٩١٠	١٠٨٠	١٥٩٠	٢٣٤٠
	مستقبلياً	٤٦٠	٥٩٠	٧٢٠	١١٣٠	
PHA	حالياً	١٣٩٠	١٦١٠	١٨٤٠	٢٥٢٠	٢١٥٠
	مستقبلياً	١٤٦٠	١٦٣٠	١٨٠٠	٢٣١٠	*PE*
حمض السكسينيك	حالياً	٨٠٠	٨٨٠	٩٦٠	١٢٠٠	١٥٦٠
	مستقبلياً	٥٥٠	٦٢٠	٦٨٠	٨٩٠	أنهيدريد الماليك
الإيثيل أسيتات	حالياً	١٢٠٠	١٣٣٠	١٤٦٠	١٨٦٠	١٨٩٠
	مستقبلياً	٨٩٠	١٠١٠	١١٤٠	١٥٢٠	الإيثيل أسيتات
الإيثيلين	حالياً	١٠٩٠	١٣٦٠	١٦٣٠	٢٤٦٠	١٥١٠
	مستقبلياً	٩٢٠	١١٨٠	١٤٤٠	٢٢٤٠	
PLA	حالياً[أ]	١٥٠٠	١٦١٠	١٧١٠	٢٠٣٠	٢١٦٠
	مستقبلياً	١٢١٠	١٣١٠	١٤١٠	١٧١٠	PET
PTT	حالياً	١٦٦٠	١٧٢٠	١٧٩٠	١٩٩٠	٢٣٠٠
	مستقبلياً	١٥٥٠	١٦٠٠	١٦٥٠	١٨١٠	

[أ] بيانات العملية مأخوذة من مصادر الصناعة.

obeikandl.com



الشكل رقم (٦ ,١٣). الجدوى الاقتصادية لتقنية التقنية الحيوية الصناعية الحالية: نسبة تكلفة الإنتاج بالإضافة إلى الأرباح (PCPP) لمنتج التقنية الحيوية الصناعية إلى نظيره البتروكيماوي للتقنية الحالية كدالة لمستوى سعر السكر (٧٠ دولاراً أمريكياً/ برميل نفط خام). EL، لاكتات الإيثيل؛ PLA، حمض البولي لاكتيك؛ PDO، ٣،١-بروبان دايول؛ PTT، البولي ثلاثي الميثيلين رباعي الفثالات؛ PHA، البولي هيدروكسي ألكانوات؛ ABE، الأسيتون-بيوتانول-إيثانول.



الشكل رقم (٧ ,١٣). الجدوى الاقتصادية لتقنية التقنية الحيوية الصناعية المستقبلية: نسبة تكلفة الإنتاج بالإضافة إلى الأرباح (PCPP) لمنتج التقنية الحيوية الصناعية مقارنةً بنظيره البتروكيماوي للتقنية المستقبلية كدالة لسعر السكر (٧٠ دولاراً أمريكياً/ برميل نفط خام).

obeikandi.com

الجدول رقم (١٣,٦). جدوى كيماويات التقنية الحيوية الصناعية لأربعة مستويات لأسعار سكر التخمير للتقنية الحالية والمستقبلية (سعر النفط الخام: ٧٠ دولار أمريكي/ برميل).

سعر السكر (يورو/ طن)	حالياً	مستقبلياً
٤٠٠	الإيثانول، PDO، حمض السكسينسك، PTT، PLA والإيثيل لاكتات	نفس الموجود حالياً
٢٠٠	الإيثانول، PDO، حمض السكسينسك، PTT، PLA والإيثيل لاكتات	ABE، الإيثيلين، الإيثانول، PDO، حمض السكسينسك، PTT، PLA والإيثيل لاكتات
١٣٥	الإيثيلين، الإيثانول، PDO، حمض السكسينسك، PTT، PLA والإيثيل لاكتات	حمض الأديبيك، ABE، الإيثيلين، الإيثانول، PDO، حمض السكسينسك، PTT، PLA والإيثيل لاكتات
٧٠	الإيثيلين، الإيثانول، PDO، حمض السكسينسك، PTT، PLA والإيثيل لاكتات	حمض الأديبيك، ABE، الإيثيلين، الإيثانول، PDO، حمض السكسينسك، PTT، PLA والإيثيل لاكتات

(١٣,٤) الاستنتاجات Conclusions

لقد قدمنا وطبقنا في هذا الفصل نهجاً عاماً يسمح بالتقييم المنهجي لطرق الإنتاج الحالية والمستقبلية للكيماويات الحيوية من التقنية الحيوية الصناعية، وذلك استناداً إلى البيانات المتاحة بما يتفق والافتراضات على التطورات التقنية (الحيوية) المستقبلية. وحتى في الوقت الحاضر، فإن المواد الكيميائية الضخمة القائمة على المصادر الحيوية من التقنية الحيوية الصناعية تقدم وفورات واضحة في استخدام الطاقة غير المتجددة وانبعاثات غازات الاحتباس الحراري بالتقنية الحالية مقارنةً بالإنتاج التقليدي للبتروكيماويات. ويمكن تحقيق المزيد من الوفورات الكبيرة في المستقبل عن طريق عمليات التخمير والتجهيز النهائي المحسنة.

ومن بين جميع المصادر الأولية، يتم تفضيل قصب السكر على المواد اللجنوسليولوزية، والتي تكون بدورها أفضل من نشا الذرة من حيث استخدام الطاقة ووفورات غازات الاحتباس الحراري. والمنتجات ذات أعلى وفورات هي البيوتانول (من عملية ABE)، والإيثانول، والإيثيلين، والـ DDO، والـ PHA.

وبشكلٍ عام، فإن عدداً كبيراً من كيماويات التقنية الحيوية الصناعية يكون مجدياً اقتصادياً بالمقارنة مع مكافئاتها البتروكيماوية. وتعتمد القدرة التنافسية الاقتصادية إلى حدٍ كبير على أسعار النفط والسكر. في حالة سعر النفط الخام٧٠ دولاراً أمريكياً/ برميل تكون المنتجات التالية ذات جدوى اقتصادية بالنسبة للتقنية الحالية: ٣،١-بروبانو دايول، والبولي ثلاثي الميثيلين رباعي الفيثالات، وحمض البولي لاكتيك، وحمض السكسينيك، ولاكتات الإيثيل، والإثيلين، والإيثانول. عند مقارنة التقنية الحالية بالمستقبلية، تكون تكاليف الإنتاج بالإضافة إلى الأرباح

للمنتجات التي يتم الحصول عليها مباشرةً من التخمير ٢٠-٤٠٪ أقل، وبالنسبة للمنتجات التي تتطلب خطوة تحويل كيميائية بعد التخمير ١٥-٢٠٪ أقل (لسعر النفط الخام ٧٠ دولاراً أمريكياً/ برميل، وعند جميع أسعار السكر). ويدل هذا على أن التقدم التقني يمكن أن يسهم بفعالية في الجدوى الاقتصادية المحسنة لكيماويات التقنية الحيوية الصناعية. بالنسبة للتقنية المستقبلية، فإن جميع المنتجات التي درست باستثناء حمض الخليك تكون مجدية اقتصادياً عند أسعار سكر التخمير من ٧٠-١٣٥ يورو/ طن. وتتحسن جميع المنتجات الأخرى في القدرة الاقتصادية التنافسية.

ومن منظور السياسة، فإن المزايا البيئية تجعل إنتاج الكيماويات الضخمة اعتماداً على المصادر الحيوية باستخدام التقنية الحيوية الصناعية مرغوباً فيه على النطاق الواسع؛ لأن وفورات أكثر من ١٠٠٪ في استخدام الطاقة غير المتجددة وانبعاثات غازات الاحتباس الحراري ممكنة بالفعل على المستوى الحالي للتقنية الحيوية. ويشكل هذا حجةً قوية لإنتاج الكيماويات الضخمة اعتماداً على المصادر الحيوية باستخدام التقنية الحيوية الصناعية عند النظر في المزايا الاقتصادية للـ ٣،١-بوبان دايول، والبولي ثلاثي الميثيلين رباعي الفثالات، وحمض البولي لاكتيك، وحمض والسكسينيك، ولاكتات الإيثيل، والإيثيلين، والإيثانول للتقنية الحالية ولجميع المنتجات باستثناء حمض الخليك للتقنية المستقبلية (انظر [١١] لأسعار النفط الأخرى). ونتيجةً لذلك، فإن استخدام التقنية الحيوية الصناعية لإنتاج الكيماويات اعتماداً على المصادر الحيوية يمكن أن يساهم بشكلٍ كبير للحد من تغير المناخ واستنفاد الطاقة الحفرية. ولذلك فإنها تكون إستراتيجية رئيسة للتنمية المستدامة للصناعة الكيميائية. ولهذا فإن الإدخال واسع المستوى لإنتاج الكيماويات الضخمة المجدية اقتصادياً الذي يعتمد على المصادر الحيوية باستخدام التقنية الحيوية الصناعية يكون مرغوباً فيه لهذه المنتجات التي تكون آثارها البيئية أصغر من تلك بالنسبة لطرق الإنتاج البتروكيماوية الحالية. وفي ظل هذه الظروف، يمكن أن تصبح التقنية الحيوية الصناعية مركز الاهتمام بالنسبة للصناعة الكيميائية، وكذلك بالنسبة لصناع القرار.

المراجع References

[١] Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Jechura, J., Neeves, K., Sheehan, J., Wallace, B., Montague, L., Slayton, A., and Lukas, J. (2002) Ligno-cellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. Technical report, National Renewable Energy Laboratory (NREL).

[٢] Akiyama, M., Tsuge, T., and Doi, Y. (2003) Environmental life cycle comparison of poly-hydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polym. Degrad. Stab.*, **80** (1), 183-194.

[٣] Bayrock, D. and Ingledew, W. (2005) Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, lactobacillus-contaminated continuous, and batch fermentations. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **21** (1), 83-88.

[٤] Bohlmann, G.M. (2004) Biodegradable packaging life-cycle assessment. *Environ. Prog.,* **23** (4), 342-346.

[٥] Campos, E., Qureshi, N., and Blascheck, H. (2002) Production of acetone butanol ethanol from degermed corn using *Clostridium beijerinckii* ba101. *Appl. Biochem. Biotechnol.,* **99** (1-3), 553-576.

[٦] Damen, K. (2001) Future prospects for biofuel production in Brazil; A chain analysis comparison of ethanol from sugarcane and methanol from eucalyptus in Sao Paulo state. Master thesis NWS-E-2001-31, Utrecht University.

[٧] Dornburg, V., Termeer, G., and Faaij, A.P. (2005) Economic and greenhouse gas emission analysis of bioenergy production using multi-product crops-case studies for the Netherlands and Poland. *Biomass Bioenergy,* **28** (5), 454-474.

[٨] Ezeji, T., Qureshi, N., and Blascheck, H. (2003) Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* ba101 and in situ recovery by gas stripping. *World J. Microbiol. Biotechnol.,* **19** (6), 595-603.

[٩] Fidaleo, M. and Moresi, M. (2005) Modeling of sodium acetate recovery from aqueous solutions by electrodialysis. *Biotechnol. Bioeng.,* **91** (5), 556-568.

[١٠] Gryta, M., Morawski, A.W., and Tomaszewska, M. (2000) Ethanol production in membrane distillation bioreactor. *Catal. Today,* **56,** 159-165.

[١١] Hermann, B.G. and Patel, M. (2007) Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology-a techno-economic analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.,* **136** (3), 361-388.

[١٢] Huang, Y., Mann, K., Novak, J., and Yang, S. (1998) Acetic acid production from fructose by *Clostridium formicoaceticum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol. Prog.,* **14** (5), 800-806.

[١٣] Huijbregts, M., Rombouts, L.J., Hellweg, S., Frischknecht, R., Hendriks, A., van de Meent, D., Ragas, A.M., Reijnders, L., and Struijs, J. (2006) Is cumulative fossil energy demand a useful indicator for the environmental per-formance of products? *Environ. Sci. Technol.,* **40** (3), 641-648.

[١٤] Kim, S., and Dale, B.E. (2005) Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions. *Biomass Bioenergy,* **28** (5), 475-489.

[١٥] Kim, S., and Dale, B.E. (2005) Life cycle assessment study of biopolymers (PHA)-derived from no-tilled corn. *Int. J. LCA,* **10** (2), 200-210.

[١٦] Landucci, R., Goodman, B., and Wyman, C. (1994) Methodology for evaluating the economics of biologically producing chemicals and materials from alternative feedstocks. *Appl. Biochem. Biotechnol.,* **45-46,** 677-696.

[١٧] Lee, J., Pagan, R., and Rogers, P.L. (1983) Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using zymomonas mobilis. *Biotechnol. Bioeng.,* **25** (3), 659-669.

[١٨] Lee, K.-R., Teng, M.-Y., Lee, H.-H., and Lai, J.-Y. (2000) Dehydration of ethanol/water mixtures by pervaporation with composite membranes of polyacrylic acid and plasma-treated polycarbonate. *J. Memb. Sci.,* **164,** 13-23.

[١٩] Lee, P.C., Lee, W.G., Lee, S.Y., Chang, H.N., and Chang, Y.K. (2000) Fermentative production of succinic acid from glucose and corn steep liquor by *Anaerobiospirillium succiniproducens*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.,* **5,** 379-381.

[٢٠] Lee, Y.Y., Balasubramanian, N., and Kim, J. (2001) Fermentation of xylose into acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.,* **92** (1-3), 367-376.

[٢١] Lynd, L. and Wang, M. (2004) A product non-specific framework for evaluating the potential of biomass-based products to displace fossil fuels. *J. Ind. Ecol.,* **7** (3-4), 17-32.

[٢٢] Macedo, I.C. (1998) Greenhouse gas emissions and bio-ethanol in Brazil. *Int. Sugar J.,* **100** (1189), 2-5.

[٢٣] Niu, W., Draths, K., and Frost, J. (2002) Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnol. Prog.,* **18,** 201-211.

[٢٤] New York Board of Trade (2005) Historical data-sugar 11. https://www.theice.com/product guide/Reports.shtml?specId=23

[٢٥] New York Board of Trade (2005) Historical data-sugar 14. https://www.theice.com/product guide/Reports.shtml? specId=23

[٢٦] ORPLANA (2005) Sugarcane payment in the Sao Paulo state-in the 2003/04 season. http:// www.orplana.com.br/estatisticas.asp accessed 31.10.2005.

[٢٧] Patel, M., Crank, M., Dornburg, V., Hermann, B.G., Roes, L., Using, B.H., Overbeek, L., Terragni, F., and Recchia, E. (2006) Medium and long-term opportunities and risks of the biotechnological production of bulk chemicals from renewable resources-the potential of white biotechnology. The BREW project. Project report, Utrecht University.

[٢٨] Patel, M., Jochem, E., Marscheider-Weidemann, F., Radgen, P., and von Thienen, N. (1999) C-STREAMS-Estimation of material, energy and CO2 flows for model systems in the context of non-energy use, from a life cycle perspective. Status and scenarios, vol. I: Estimates for the total system. Technical report, Fraunhofer Institute for Systems and Innovation Research (ISI).

[٢٩] Quirin, M., Artner, S.O.G., Pehnt, M., and Reinhardt, G.A. (2004) CO2 mitigation through biofuels in the transport sector-status and perspectives. Technical report, Institut f. Energie-und Umweltforschung (IFEU) Heidel-berg GmbH.

[٣٠] Qureshi, N. and Blascheck, H. (2001) Abe production from corn: a recent economic evaluation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **27,** 292-297.

[٣١] Reddy Kunduru, M. and Pometto, A. (1996) Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **16** (4), 249-256.

[٣٢] Reismann, H. (1988) *Economic Analysis of Fermentation Processes,* CRC Press, Florida.

[٣٣] Rupp-Dahlem, C. (2005) Time series on London no.5 sugar prices, 03.11.2005, personal communication.

[٣٤] Sheehan, J., Aden, A., Paustian, K., Killian, K., Brenner, J., Walsh, M., and Nelson, R. (2003) Energy and environmental aspects of using corn stover for fuel ethanol. *J. Ind. Ecol.*, **7** (3-4), 117-146.

[٣٥] Simons, P. and Nossin, P. (2005) Investment cost calculations (fum). Technical report, DSM.

[٣٦] SRI (1999) 1,3-Propanediol and polytrimethyl-ene terephthalate. Technical report PEP 227, SRI Consulting.

[٣٧] SRI (2000) *PEP Yearbook International, Volume 2M Germany of Process Economics Program,* SRI Consulting, Menlo Park, CA.

[٣٨] SRI (2001) Chemicals from renewable resources. Technical report PEP 236, SRI Consulting.

[٣٩] SRI (2002) Biotechnology separation processes. Technical report PEP 188B, SRI Consulting.

[٤٠] SRI (2002) Polyhydroxyalkanoates from organic wastes. Technical report PEP 2002-8, SRI Consulting.

[٤١] Vink, E.T., Hettenhaus, J., Kim, S., and Dale, B.E. The Life Cycle of Natureworks™ Poly-lactide. 1. Corn production inventory data and corn production eco-profile. Unpublished report, Cargill Dow BV.

[٤٢] Vink, E.T., Hettenhaus, J., O'Connor, R., Dale, B.E., Tsobanakis, P., and Stover, D. The Life Cycle of Natureworks™ Polylactide. 2. The production of dextrose via corn wet milling. Unpublished report, Cargill Dow BV.

[٤٣] Vink, E.T., Abago, K.R., Glassner, D., and Gruber, P. (2003) Applications of life cycle assessment to Natureworks™ polylactide (PLA) production. *Polym. Degrad. Stab.*, **80** (3), 403-419.

[٤٤] Weidema, B. (2000) Avoiding co-product allocation in life-cycle assessment. *J. Ind. Ecol.*, **4** (3), 11-33.

[٤٥] Weissermel, K. and Arpe, H.-J. (2003) *Industrial Organic Chemistry,* 4th edn,Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[٤٦] Wibowo, C., Chang, W.-C., and Ng, K.M. (2001) Design of integrated crystallization systems. *AIChE J.*, **47** (11), 2474-2492.

[٤٧] Wisniewski, M. and Pierzchalska, M. (2005) Recovery of carboxylic acids c1-c3 with organophosphine oxide solvating extractants. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **80** (12), 1425-1430.

[٤٨] Zeikus, J., Jain, M., and Elankovan, P. (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51** (5), 545-552.

الفصل الرابع عشر

القضايا الاجتماعية في التقنية الحيوية الصناعية
SOCIETAL ISSUES IN INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY

باتريشيا أوسيوايجر، كلاوس أمان، و جوليان كيندرليرير

Patricia Osseweijer, Klaus Ammann, and Julian Kinderlerer

(١٤, ١) المقدمة Introduction

أصبح الوقود الحيوي موضوعاً ساخناً في السنوات الأخيرة. وقد ألقي اللوم على حرق الزيوت الحفرية لمساهمتها في ظاهرة الاحتباس الحراري وزاد سعر النفط زيادة سريعة. وعليه يجري البحث عن بدائل أخرى. وتقدم وسائل الإعلام تقريباً كل يوم تقريراً عن بعض القضايا المتعلقة بالوقود الحيوي، معربةً عن المؤيدين والمعارضين لهذا التطبيق الجديد للتقنية الحيوية الصناعية. ويشكك الجدال خاصةً ما إذا كان يمكن للوقود الحيوي في الواقع تقليل غازات الاحتباس الحراري وإذا كان لدينا أرضاً كافيةً لزراعة الكتلة الحيوية اللازمة. وهو يشكك في التأثير في كلٍ من المجتمعات الغربية والبلدان النامية. ويخشى بعض المعلقين أن نخاطر بغذائنا المتوافر لسكان العالم الذين يتزايد عددهم، مما يرفع من أسعار المواد الغذائية بطريقة إشكالية، فيما يتخوف الآخرون من تدمير الغابات المطيرة. في هذا المناخ المتناقض يكافح السياسيون من أجل تطوير تدابير سياسية لتقليل الاعتماد على الدول المنتجة للنفط، ومن أجل زيادة الاستدامة، ولكسب منافع بيئية.

ما معنى هذا النقاش القوي على الوقود الحيوي لتنمية التقنية الحيوية الصناعية؟ ما الذي تعلمناه من المناقشات العامة السابقة حول التقنية الحيوية وكيف يمكننا تطبيق هذه الدروس لدعم مواصلة تطوير و إنجاز التقنية الحيوية الصناعية؟

كان ينظر للتقنية الحيوية الحديثة منذ فترة طويلة على أنها تقنية رئيسة واعدة بنوعية حياة أفضل لجميع مواطني العالم. وقد ترافق تطورها، مع ذلك، مع القلق والانتقادات حول الأساليب التي تستخدمها. وفي وقت مبكر عام ١٩٩٢م أشارت البلدان التي ناقشت حالة العالم في القرن الحادي والعشرين إلى أن التقنية الحيوية تمتلك

القدرة على تمكين "تطوير، على سبيل المثال الرعاية الصحية الأفضل، وتعزيز الأمن الغذائي من خلال الممارسات الزراعية المستدامة، وتحسين إمدادات المياه الصالحة للشرب، وعمليات التطوير الصناعية الأكثر كفاءة لتحويل المواد الخام، ودعم الأساليب المستدامة لإزالة الغابات وإعادة التشجير، ونزع سموم النفايات الخطرة" (برنامج ٢١، الفصل السادس عشر؛ http://earthwatch.unep.net/agenda21/16.php).

فعلى سبيل المثال، كانت هناك مخاوف تقنية مبكرة عن استخدام مؤشرات المضادات الحيوية في تطوير المحاصيل المحورة وراثياً والقضايا الأخلاقية عن مبادئ الهندسة الوراثية والتي أدت إلى اتهامات بـ"القيام بدور الله" و"تسجيل براءة اختراع الحياة". وفي وقتٍ لاحق كانت هناك مخاوف بشأن المخاطر والفرص المحتملة لاختيار المستهلك في الغذاء المعدل وراثياً (GM). وفي الواقع فقد أصبح غذاء "فرانكشتاين" قضية كبيرة حتى أن كثيرة من محلات المواد الغذائية منعت الكثير من المنتجات المحتوية على الـ GM من التواجد على رفوفها. وقد أدى النقاش العام في نهاية المطاف إلى الإيقاف الفعال للمحاصيل المعدلة وراثياً منذ عام ١٩٩٩م، والذي يرفع ببطء في الوقت الحاضر [١]. هل هذه المخاوف وثيقة الصلة بتطوير التقنية الحيوية الصناعية؟

يمثل النبيذ والبيرة والخبز والجبن بعضاً من أمثلة التقنية الحيوية الصناعية شديدة القدم والتي تكون مقبولة بطبيعة الحال على نطاقٍ واسع. وقد تم تحسين السلالات المستخدمة في إنتاجها على مر السنين، وذلك باستخدام الكثير من التقنيات المختلفة، بما في ذلك التربية الانتقائية، والطفرات المستحثة بواسطة الأشعة، وفي الآونة الأخيرة التعديل الوراثي. ولكن عندما استخدمت هذه التقنيات الحديثة لإنتاج الكيموسين لصناعة الجبن، على سبيل المثال، لم يقابل هذا في كل مكان بالحماس العظيم على الرغم من حقيقة أنه يمكن أن يحل محل استخدام بطن العجول حديثة الولادة المذبوحة. كما أنه أيضاً من التناقض أن صفات قمح الدوروم الحديثة، المستخدم لإنتاج المعكرونة في جميع أنحاء العالم، والناجمة عن الزراعة بطفرة الإشعاع، يبدو أنها مقبولة من أغلبية المنتجين والمستهلكين. رغم أنها تعدُّ من وجهة نظر العلوم الجزيئية وسيلة زراعة غير مستهدفة بصورةٍ أكثر، مع آثار غير معروفة وعشوائية على الجينوم. وهذا يعني أن التعديل في الموقع يكون مقبولاً، ولكن إدخال جزء متناهي الصغر من الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المشتق من كائن حي آخر يكون غير مقبول.

وفي المجتمع المتغير الذي يدفع لاقتصاد يحركه الطلب تسبب هذه الأمثلة الحذر داخل معظم شركات التقنية الحيوية، وحتى أكثر من ذلك في الصناعات العملية والتجزئة التي تستخدم هذه المكونات في منتجاتها.

في حين تهدف التقنية الحيوية الصناعية إلى تقديم حلول مستدامة لإنتاج السلع الاستهلاكية، والطاقة، والمواد الصيدلانية، والتطبيقات البيئية فإنه من المرجح أيضاً أن هذه التطبيقات الحديثة للغاية سوف تقابل بالرفض على الأقل من جانبٍ من مجتمعاتنا، كما هو موضح أعلاه بالنسبة لتطبيقات الوقود الحيوي. ولذلك تكون

الشركات مترددة في تقديم هذه المنتجات أو حتى تطويرها، بسبب الردود السلبية المتوقعة للمستهلك التي يتم تحفيزها لا سيما من قبل المنظمات غير الحكومية النشطة (NGOs). ويناضل متخذي القرار من أجل إيجاد التوازن بين تعزيز وضمان التنمية المستدامة والمقاومة المتوقعة للجمهور.

إن تمثيل وتفسير المعلومات العلمية، وطرق التواصل والتفاعل العام، والقضايا الأخلاقية، والقانونية والاقتصادية ومسائل السلامة هي عناصر مهمة في تشكيل الرأي العام. كما تم الإشارة بقوة إلى أن مبادرات التواصل في الوقت المناسب والكافي، والاستباقية والتفاعلية تساعد على تقديم التطبيقات الجديدة المفيدة اجتماعياً. ولذلك فإنه يتم الترويج للحوار بين جميع أصحاب المصلحة الرئيسين خلال المراحل الأولى للتطوير على أنه مفتاح حاسم لتحقيق الإمكانات التي توفرها الابتكارات في علم الجينوم الصناعي.

وقبل أن ندخل في المشاركة الفعالة المبكرة والتفاعل مع المجتمع الأوسع فإننا بحاجة إلى فهم القضايا المطروحة وتحديد أصحاب المصلحة ذوي الصلة في مثل الزراعة والصناعة (الكيميائية)، وتجارة التجزئة والنقل، والحكومة المحلية، والتنمية الإقليمية. لذلك فإننا بحاجة لتحقيق وكشف الآثار المجتمعية لمزيدٍ من الاقتصاد القائم على المصادر الحيوية ولفهم القضايا المجتمعية المحتملة حتى نتمكن من الاستعداد للتنفيذ المقبول بصفةٍ عامة والذي من المرجح أن يكون ناجحاً.

لذلك يستكشف هذا الفصل تأثير اقتصاد الكتلة الحيوية والجدل حول القضايا المجتمعية الناتجة عن ذلك. وهو يأخذ الدروس من مناقشات الأغذية المعدلة وراثياً لاقتراح بعض النصائح حول ما يمكن للأوساط الأكاديمية والصناعية القيام به من أجل تعزيز التقديم المستدام للتقنية الحيوية الصناعية التي تكون مقبولة لدى معظم المجتمع المدني.

(١٤,٢) أثر التقنية الحيوية الصناعية The Impact of Industrial Biotechnology

قبل أن نقول أي شيء عن القضايا المجتمعية للتقنية الحيوية الصناعية فإننا نحتاج إلى استكشاف تأثيرها المحتمل في مجتمعنا. ومن أجل ذلك فإننا نستخدم تعريف التقنية الحيوية الصناعية من البرنامج الأوروبي للكيمياء المستدامة (سوشيم)[1]:

> التقنية الحيوية الصناعية هي تطبيق التقنية الحيوية لمعالجة وإنتاج المواد والكيماويات والوقود. وهي تستخدم الإنزيمات، والكائنات الحية الدقيقة وخطوط الخلايا لصنع المنتجات في قطاعات مثل الكيمياء، والصيدلة، والأغذية والأعلاف والورق واللب والمنسوجات والطاقة، والمواد والبوليمرات.

(١) نشرة سوشيم ٢٠٠٦م يمكن تحميلها من الموقع: suschem.org.

تهدف التقنية الحيوية الصناعية مع هذا النهج إلى توفير إنتاج أكثر استدامة للسلع الاستهلاكية، ومصادر الطاقة، والمواد الصيدلانية، على سبيل المثال، استبدال الزيوت المعدنية بالكتلة الحيوية كمواد أساسية. ويتم الزعم بأن الحد من انبعاثات ثاني أكسيد الكربون سوف يساعد في تخفيف ظاهرة الاحتباس الحراري في حين يجب أن يقلل تطبيق التقنية الحيوية في عمليات الإنتاج بشكلٍ واضح من استخدام كلٍ من الطاقة والمياه وإنتاج المنتجات الثانوية غير المرغوب فيها ومياه الصرف الصحي.

(١ ,٢ ,١٤) كيف يؤثر هذا على مجتمعنا؟ How Does This Influence Our Society?

في المقام الأول والأهم، سوف يكون لاستبدال النفط بالكتلة الحيوية تأثير في اقتصاداتنا والعلاقات التجارية العالمية. وقد أدى الإنتاج المتزايد للمواد الكيميائية الدقيقة والمكونات الصيدلانية من الخميرة والفطريات والبكتيريا بالفعل إلى الزيادة الكبيرة في الطلب على السكر مع الزيادة اللاحقة في الأسعار. ومع ذلك، عندما يتم إنتاج المواد الكيميائية الضخمة بهذه الطريقة، بما في ذلك الوقود الحيوي مثل الإيثانول الحيوي، فإن الطلب على السكريات والزيوت النباتية سوف يزيد بصورةٍ أبعد من ذلك بكثير (كما يظهر من اعتماد سعر السكر على سعر النفط[٢]) [٢]. وكما هو موضح في فصولٍ أخرى من هذا الكتاب، فإن البحث العلمي يركز حالياً على استخدام مواد الكتلة الحيوية الأخرى كمواد أولية لعمليات التخمير، بما في ذلك مواد النفايات المنزلية والزراعية. ورغم أن هذا يزيد من الاستخدام لكل وحدة من الكتلة الحيوية المنتجة، فإنه لا يزال يتطلب مساهمة زراعية ضخمة مع تأثير رئيس على السوق التجارية العالمية، وعليه على الاقتصادات المحلية.

ثانياً، سوف يغير الجزء الأكبر من إنتاج الطاقة، والمواد الكيميائية، والمواد من خلال الكتلة الحيوية من المشهد لدينا. قد يمكن اعتبار الأراضي البور، ومنتجعات الاستجمام، والغابات، وربما حتى المحيطات والصحاري كمنتجين إضافيين للكتلة الحيوية. وقد تستبدل المصافي الحيوية الصغيرة المفاهيم القديمة لأبراج المياه ومحطات الغاز من أوائل القرن العشرين. وسوف يتطلب هذا تغييراً في البنية التحتية لوسائل النقل لدينا ويتطلب عدداً من المصافي الحيوية صغيرة وكبيرة المستوى، وتكون هذه الأخيرة قريبة من موقع إنتاج الكتلة الحيوية لتقليل تكاليف النقل[٣].

ثالثاً، إن تحول الصناعات لعمليات الإنتاج الأخرى سوف يؤثر في كامل سلسلة الإنتاج، والتي ستغير الاحتياجات من المهارات وفرص العمل. وسوف تؤثر جميع التغيرات بصورةٍ مباشرة أو غير مباشرة في المجتمعات

(٢) يمكن تحميل الكثير من التقارير المتصلة من الموقع: http://www.europabio.org/facts_white.htm.

(٣) الوقود الحيوي للنقل. الآثار والاحتمالية العالمية للزراعة المستدامة والطاقة في القرن الواحد والعشرين (معهد الرصد العالمي) ٠٦/ ٢٠٠٦م، متاحة من: http://www.europabio.org/facts_white.htm.

المحلية. وقد يمتلك المزارعون سوقاً أكبر لمحاصيلهم، وقد يضطر المواطنين لإعادة تدوير نفايات الكتلة الحيوية المحلية، وقد يحتاج السياسيون إلى توفير حوافز جديدة من أجل موازنة الاقتصاد ضد البيئة، وقد يضطر مديري الصناعة إلى اختيار متى وكيف (وعلى أي نطاق) للاستثمار في مرافق الإنتاج الجديدة. وقد تحتاج الدول النفطية أيضاً إلى إيجاد ايرادات بديلة، في حين أن البلدان النامية قد تواجه اختيارات صعبة إما لإنتاج الغذاء أو تصدير الكتلة الحيوية. وعلاوةً على ذلك، فإن المجتمعات في كل مكان قد تضطر لدعم استخدام المحاصيل المعدلة وراثياً بصورةٍ كاملة على الأقل بطريقة تعايشية، حيث إنه من المحتمل جداً أن المحاصيل المعدلة وراثياً فقط سوف تفي بالكمية المطلوبة من الكتلة الحيوية مع أقل تأثير على إمدادات الغذاء والماء، واستخدام المغذيات وأقل عبء على البيئة.

(١٤ ,٢ ,٢) ما هي المحفزات والعقبات السياسية والصناعية والاقتصادية والعلمية؟

What Are the Political, Industrial, Economic, and Scientific Drivers and Obstacles?

أدت المخاوف الأخيرة حول ظاهرة الاحتباس الحراري إلى سلسلة من التقارير والاتفاقات الدولية. ويعد بروتوكول كيوتو هو الأكثر شهرة، والذي تم في عام ١٩٩٧م وتم التصديق عليه في عام ٢٠٠٥م بعد توقيع روسيا. تتعهد البلدان المصدقة في جميع أنحاء العالم بخفض انبعاثاتها من الغازات المسببة للاحتباس الحراري إلى حد كبير بمتوسط ٢ ,٥٪ للفترة ٢٠٠٨-٢٠١٢م مقارنةً بالمستويات في عام ١٩٩٠م. لم توقع الولايات المتحدة على الاتفاقية. وتهدف الاتفاقات التالية لكيوتو عامة إلى التخفيضات الأعلى. ولكن هذا ليس هو المحفز الوحيد للاقتصاد القائم على المصادر الحيوية.

والأسباب الرئيسة لتشجيع الحكومات على انفاذ المجتمع القائم على المصادر الحيوية لاستبدال الوقود الحفري هي:

١- زيادة القدرة التنافسية والابتكار للصناعة.

٢- الحد من التلوث البيئي والجوي.

٣- استبدال الوقود الحفري المتناقص بسرعة والذي تتزايد الاحتياجات العالمية له؛ بسبب زيادة النمو الاقتصادي في المجتمعات النامية بسرعة مثل الصين والهند وتزايد عدد سكان العالم.

٤- استبدال الوقود الحفري الذي يزيد استخدامه من انبعاثات غازات الاحتباس الحراري التي تعدُّ مساهماً رئيساً في ظاهرة الاحتباس الحراري.

٥- تقليل الاعتماد على الدول المنتجة للنفط.

وقد تتضمن الأسباب الأخرى للمجتمعات الوطنية منافذ جديدة للمزارعين الوطنيين (في أوروبا) أو فرص جديدة للتصدير (للبلدان النامية). ويتم دفع الصناعات من قبل تزايد أسعار النفط والحوافز التي تقدمها الحكومة،

ولكن هذا ليس معادلة بسيطة حيث ترتبط أسعار السكر الآن بأسعار النفط، كما لم تقرر معظم الحكومات بعد الحوافز الواجب تنفيذها. ويشير تقرير ماكينزي [٢] إلى أن تطور المجتمع القائم على المصادر الحيوية يعتمد على:

- أسعار الوقود.
- أسعار المواد الخام.
- القواعد الحكومية.
- توافر تقنيات التحويل (الابتكار).

وقد تم تفصيل التحديات العلمية في فصولٍ أخرى من هذا الكتاب، وهي تشمل تطوير المحفزات الحيوية الجديدة لعمليات الإنتاج، وتطوير الجيل الثاني من الوقود الحيوي والمواد الكيميائية الكبيرة عن طريق تحسين ظروف العملية، والكائنات الحية الدقيقة، وتخصصية الإنزيمات. ويتم دفع هذه التطورات أساساً بواسطة برامج البحوث الوطنية (العالمية)، بناءً على نصيحة تدريبات رسم خرائط الطرق المعدة بواسطة خبراء التقنية الحيوية من الصناعة والأوساط الأكاديمية (EuropaBio، BIO، OECD، والاتحاد الأوروبي، ومنصات التقنية مثل سوشيم وإيبوبيو، ...إلخ[٤]). والتحديات الصناعية هي عدم اليقين من فرص السوق والتنظيم، وإنفاق البحث والتطوير والفرص المبتكرة. وقد حسب ماكينزي أن سوق التقنية الحيوية الصناعية يضم ٧٪ من السوق الكيميائية بشكلٍ عام، الذي يعادل ٧٧ مليار يورو في عام ٢٠٠٥م. ومن المتوقع أنه سوف ينمو إلى ١٠٪ في عام ٢٠١٠م (١٢٥ مليار يورو). وقد حسبوا أيضاً (بافتراض متحفظ) أن تزويد المادة الخام الحالي سوف يكون كافياً لاستبدال نحو ٥٠٪ من نفط النقل المطلوبة. وهذا الرقم قابل للنقاش بصورةٍ كبيرة حيث إنه يضم عدداً من الافتراضات غير المؤكدة.

(١٤,٣) التصورات العامة للتقنية الحيوية الصناعية Public Perceptions of Industrial Biotechnology

كما سبق بيانه في مقدمة هذا الفصل، فإن تطوير المجتمع القائم على المصادر الحيوية حالياً هو موضع جدل ساخن في وسائل الإعلام. وتنطلق آراء قوية تهدف إلى التأثير في عملية صنع القرار السياسي. ففي ٢٦ أكتوبر ٢٠٠٧م طلب خبير الأمم المتحدة جان زيجلر وقف إنفاذ المصافي الحيوية؛ وذلك لتوفير الوقت لتطوير الجيل الثاني من الوقود الحيوي بشكلٍ كامل[٥]. والسؤال هو، هل سوف يكون لهذا أيضاً تأثير على الدعم العام للتطوير الكامل للمجال الأوسع للتقنية الحيوية الصناعية؟

---

(٤) http://www.europabio.org/facts_white.htm: لعدد من التقارير ذات الصلة (يمكن تحميلها).

(٥) مراسل الأمم المتحدة الخاص المعني بالحق في الغذاء [جان زيغلر] دعا يوم الجمعة للوقف العام على الوقود الحيوي لمدة خمس سنوات، قائلاً أنها "جريمة ضد الإنسانية" لتحويل المحاصيل الغذائية إلى وقود. رويترز في ٢٦-١٠-٢٠٠٧م.

obeikandi.com

ما هو المعروف عن الدعم الحالي لتطبيقات التقنية الحيوية الصناعية وما هو تأثير التصورات العامة على صنع القرار السياسي؟ هل يمكننا مقارنتها مع جدال الأغذية المعدلة وراثياً التي جرت في منعطف القرن والتي أثرت بشكلٍ كبير في إنفاذ منتجات الأغذية المعدلة وراثياً في أوروبا؟

(١, ٣, ١٤) ما هو التصور العام الحالي للتقنية الحيوية الصناعية؟

What is the Present Public Perception of Industrial Biotechnology?

في أوروبا، تم إجراء عدد من الدراسات الاستقصائية الممولة من قبل المفوضية الأوروبية لقياس التصورات العامة لعلوم الحياة والتقنيات الناشئة مراراً وتكراراً في شكلٍ مماثل على مدى عدد من السنوات (١٩٩١م، ١٩٩٣م، ١٩٩٦م، ١٩٩٩م، ٢٠٠٢م، و٢٠٠٥م[٦]). وتغطي هذه الدراسات جميع الدول الأعضاء في الاتحاد الأوروبي مع منهجية أخذ عينات من حوالي ١٠٠٠ مستجيب عن طريق مقابلات شخصية، مع الدراسات اللاحقة التي تمكن من المقارنة بين أوروبا والولايات المتحدة وكندا.

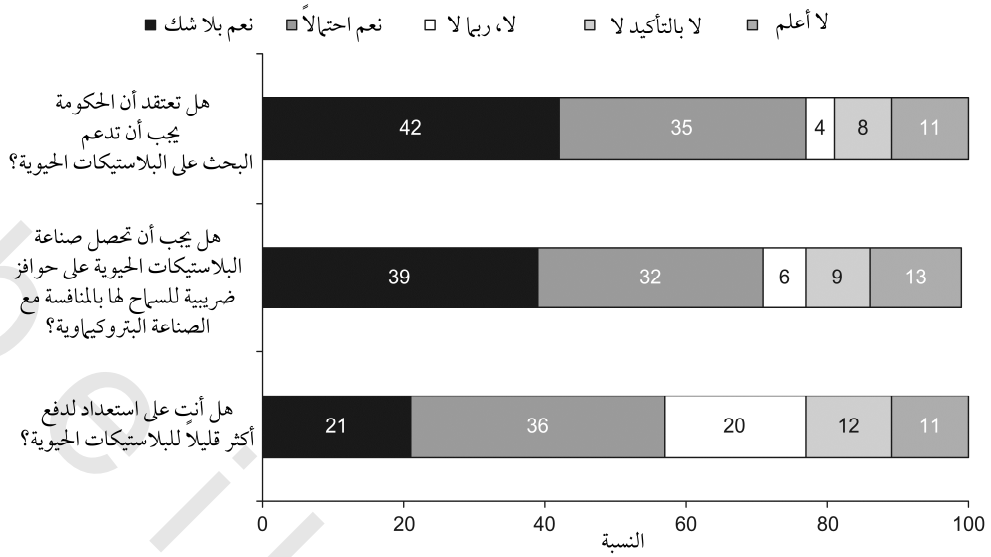
وشملت الدراسة الأخيرة التي أجريت في عام ٢٠٠٥م عدداً من الأسئلة المتعلقة بالتقنية الحيوية الصناعية حول الوقود الحيوي (المعرف بـ"تطوير المحاصيل الخاصة التي يمكن تحويلها إلى إيثانول كبديل أو إضافة للبنزين أو لوقود الديزل الحيوي") والبلاستيكات الحيوية (المعرفة بـ"استخدام صناعي آخر لنباتات المحاصيل هو صناعة البلاستيكات الحيوية. هذه، كما يتم الزعم، سوف تكون أقل إتلافاً للبيئة حيث يمكن إعادة تدويرها بسهولة وهي قابلة للتحلل الحيوي"). ووجد أن ٧٧٪ من المواطنين الأوروبيين قد أيدوا الرؤية بأن الحكومات يجب أن تدعم البحوث المتعلقة بالبلاستيكات الحيوية، مع موافقة ٧١٪ على الحوافز الضريبية. وقد تكون (أو ربما تكون) الأغلبية الأصغر لـ ٥٧٪ على استعداد لدفع إضافةً قليلة للبلاستيكات الحيوية (الشكل رقم ١, ١٤).

يدل الشكل رقم (٢, ١٤) على أن ٧١٪ وافقوا أيضاً بلا ريب أو ربما على توفير الحوافز الضريبية لشركات الوقود الحيوي. وعلى الرغم من ذلك فإن مجموعة أصغر بكثير من ٤٧٪ كانت على استعداد لدفع المزيد لشراء سيارة مصممة لتعمل على الوقود الحيوي وحتى أقل (٤١٪) كانوا على استعداد لدفع أكثر بقليل للوقود الحيوي.

وخلص باحثوا اليوروبارومیتر [٣] إلى أنه هناك بصفةٍ عامة دعم للتطورات في التقنية الحيوية الصناعية. ومع ذلك، فإننا نجادل بأنه يوجد سبب الحذر.

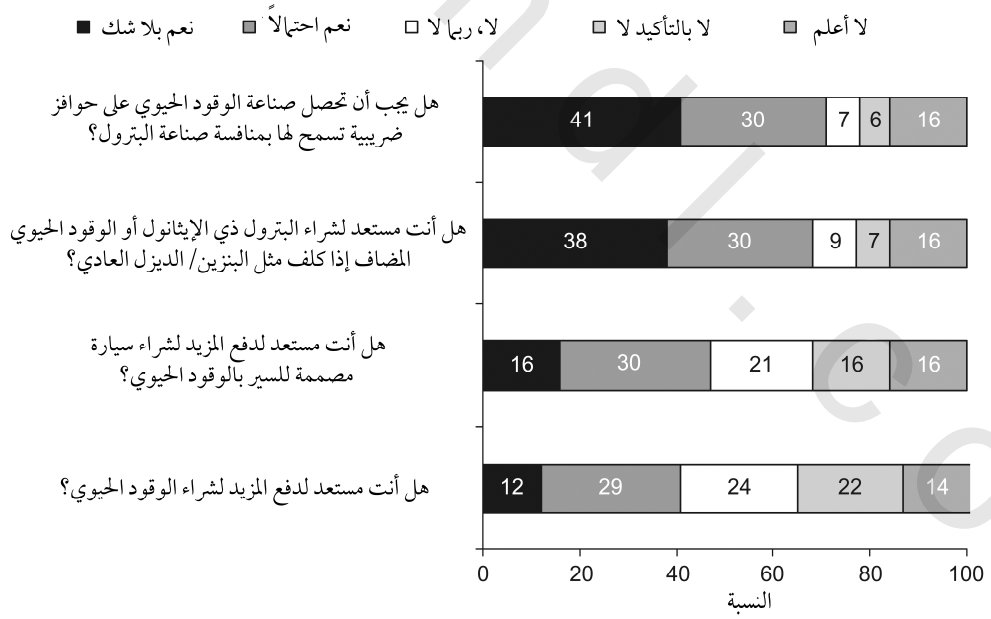
---

(٦) تقارير يوروبارومیتر في: http://ec.europa.eu/public_opinion/index_em.htm.



الشكل رقم (١٤,١). متوسط الدعم الأوروبي للبلاستيكات الحيوية، المعرفة بـ"استخدام صناعي آخر لنباتات المحاصيل هو صناعة البلاستيكات الحيوية. هذه، كما يتم الزعم، سوف تكون أقل إتلاف للبيئة حيث يمكن إعادة تدويرها بسهولة وهي قابلة للتحلل الحيوي". جاسكل وآخرون [٣]، دراسات يوروباروميتر متوفرة في:

http://www.ec.europa.eu/research/press/ 2006/pdf/pr1906_eb_64_3_final_report-may2006_en.pdf.



الشكل رقم (١٤,٢). متوسط الدعم لمواطني الاتحاد الأوروبي للوقود الحيوي، المعرف بـ"تطوير المحاصيل الخاصة التي يمكن تحويلها إلى إيثانول كبديل أو إضافة للبنزين أو لوقود الديزل الحيوي". جاسكل وآخرون [٣]، دراسات يوروباروميتر متوفرة في:

http://www.ec.europa.eu/research/press/2006/pdf/pr1906_eb_64_3_final_report-may2006_en.pdf.

obeikandl.com

وإذا قارنا هذا مع مستويات الدعم للأغذية المعدلة وراثياً في عام ١٩٩٦م فإننا نرى مستوى مماثل للدعم. على الرغم من أن الدعم يختلف بصورةٍ كبيرة لكل بلد، كان متوسط "الدعم الصريح" و"الدعم المتساهل مع المجازفة" للغذاء المعدل وراثياً أكثر من ٦٠٪. ومع تزايد الجدل حول الأغذية المعدلة وراثياً من ١٩٩٦م حتى ١٩٩٩م والقضايا المعروضة بصورةٍ عاطفية في وسائل الإعلام، انخفض هذا الدعم إلى ٤٧٪ في عام ١٩٩٩م. وعندما تضائلت التقارير الإعلامية عاد إلى ٥٣٪ في عام ٢٠٠٢م. لكنه انخفض مرة أخرى حتى ما دون مستويات ١٩٩٩م (الشكل رقم ١٤,٣). فهل سينخفض الدعم للتقنية الحيوية الصناعية أيضاً الآن حيث إن وسائل الإعلام تغطيه بشكلٍ عاطفي؟ ما الذي تعلمناه من جدال الأغذية المعدلة وراثياً؟ دعونا نبدأ مع النظر في كيفية تأثير التصور العام على تطوير التقنية.



الشكل رقم (١٤,٣). متوسط مستجيبي دول الاتحاد الأوروبي ذوي "الدعم الصريح" و"الدعم المتساهل مع المجازفة" للأغذية المعدلة وراثياً. طبقاً لجاسكل وآخرون [٣]، دراسات يوروباروميتر متوفرة في:

http://www.ec.europa.eu/research/press/2006/pdf/pr1906_eb_64_3_final_report-may2006_en.pdf.

(١٤,٣,٢) ما هو تأثير التصور العام على تطوير السياسات؟

What is the Impact of Public Perception to Plicy Developments?

عندما دخلت أول شحنة من فول الصويا المعدل وراثياً إلى أوروبا في عام ١٩٩٦م بدأ الدعم العام المبدئي للأغذية المعدلة وراثياً في الانخفاض بسرعة بعد الانتقادات الثقيلة من قبل المنظمات غير الحكومية مثل منظمة السلام الأخضر. وقد أدى ذلك إلى تساؤلات حول الآثار الصحية والبيئية التي رافقتها الاحتجاجات والمقاطعات، وزيادة البحوث على المخاطر. وواجهت أوروبا في عام ١٩٩٩م وقف فعلي لتسويق المحاصيل

والأغذية المعدلة وراثياً. ويمكن القول بأن هناك عدة أسباب لهذا التوقف السياسي. ومع ذلك فإن أكثر نتيجة مباشرة كانت اتخاذ شركات الأغذية تدابير لتغيير تكوين منتجاتها لتتجنب التعديل الوراثي.

(١٤,٣,٣) ردود الفعل الصناعية على توسيم منتجات الغذاء المعدلة وراثياً

Industrial Reactions to Labeling of GM Food Products

لقد تم اقتراح أن القلق العام، والتغطية الإعلامية المثيرة، والحملات الانتهازية لبعض المنظمات غير الحكومية، والممارسات غير الحكيمة لبعض القطاعات الصناعية قد أدت جميعها دوراً في صعود عداء الرأي العام لهذه التقنية الجديدة. كما ذكر أن دعم الزراعة العضوية مع المعارضة المتزايدة لـ"العولمة" والخوف من هيمنة الشركات الكبيرة متعددة الجنسيات على السوق كانت من أسباب تراجع التأييد العام. وبالإضافة إلى ذلك، فقد اعتبرت مصادفة ظهور مرض جنون البقر (BSE) ومخاوف المواد الغذائية الأخرى، حتى غير المرتبطة بالتقنية الحيوية مسئولة عن إرباك الرأي العام [٤]. ووفر خوف الجمهور الحافز لاتخاذ تدابير سياسية في التنظيم. واعتبر أنها في الواقع ضرورة سياسية على الصعيدين الأوروبي والوطني لتعزيز التوجيهات القائمة وزيادة التشريعات التي من شأنها إدخال توسيم الأغذية المعدلة وراثياً.

وقد تم تعديل التوجيه ٩٠/ ٢٢٩ الذي تم اعتماده في عام ١٩٩٠م على استخدام الكائنات الحية الدقيقة المعدلة وراثياً للأغراض البحثية وغير التسويقية في عام ١٩٩٨م إلى التوجيه ٩٨/ ٨١. وهو يقدم، من بين أمورٍ أخرى، "شرط للدول الأعضاء لضمان التوسيم والتتبع في جميع مراحل طرح الكائنات المعدلة وراثياً في السوق". وقد اعتمد هذا الإجراء لتوفير المعلومات للمستهلك باعتبارها أساس الاختيار الواعي، وللتمكن من اقتفاء أي مشكلات إلى مصدرها الأصلي [٤]. وقد تم تطوير تدابير للتصريح، والتتبع، وتوسيم الكائنات المعدلة وراثياً، وكذلك الأغذية والأعلاف المنتجة من الكائنات المعدلة وراثياً، مما أدى إلى اللائحة ١٨٢٩/ ٢٠٠٣م ١٨٣٠/ ٢٠٠٣م التي بدأ تنفيذها من أبريل ٢٠٠٤م. ومع ذلك، فقد غير غالبية منتجي الأغذية مكوناتهم إلى غير المعدلة وراثياً مع إدخال نظام وضع العلامات، مما أدى إلى الغياب الحالي لاختيار المستهلكين.

في الوقت الحالي فإن أقل من ٠,٥٪ من الأغذية في الأسواق المركزية الأوروبية توسم باحتوائها على مكونات معدلة وراثياً أو تصنع بمساعدة تقنيات التعديل الوراثي. وعلاوةً على ذلك فإن عدد من البلدان الأوروبية لا تبيع أي منتجات معدلة وراثياً (من بينها، اليونان، والسويد، وسلوفينيا، وألمانيا وبولندا، وسويسرا)[٧]. وقد أثرت هذه التدابير من قبل منتجي الأغذية بصورةٍ مباشرة على مقدمي المكونات الغذائية، الذين

(٧) تقرير "اختيار المستهلك" النهائي المتوفر في: http//www.KcL.ac.uk/schools/biohealth/research/nutritional/consumer/choice/download.html.

خسروا أسواقهم الأوروبية لأي شيء يحتاج لوضع العلامات وهم الآن مترددون في تقديم المنتجات الجديدة القائمة على أحدث بحوث علم الجينوم.

لا يوجد أي مبرر لهذا التأثير. فقد تم إدخال وضع العلامات لإعطاء المستهلكين الاختيار لشراء إما المنتجات المعدلة وراثياً أو غير المعدلة وراثياً. إذاً فلماذا استبدلت الشركات الكبيرة المصنعة للمواد الغذائية المكونات المعدلة وراثياً بالمكونات غير المعدلة وراثياً؟ فالمكونات غير المعدلة وراثياً لم تكن أرخص، ولم تكن هناك مؤشرات تدل على أن المكونات المعدلة وراثياً كانت أكثر خطورة لصحة المستهلك(٨) [٥-٧] كما وفرت التشريعات نظام معلومات جديرة بالثقة مع التصاريح اللازمة في الموقع من أجل السيطرة. ولذلك يبدو أن شركات الأغذية إما أصيبت بالهلع نتيجة دراسات التصور العام السلبية في عام ١٩٩٩م والتي تصورت الشركات أنها تؤثر بشدة في مبيعاتها وإما أنها كانت حذرة من حملات المنظمات البيئية التي يمكن أن تؤثر في صورتها ومن ثم مبيعاتها.

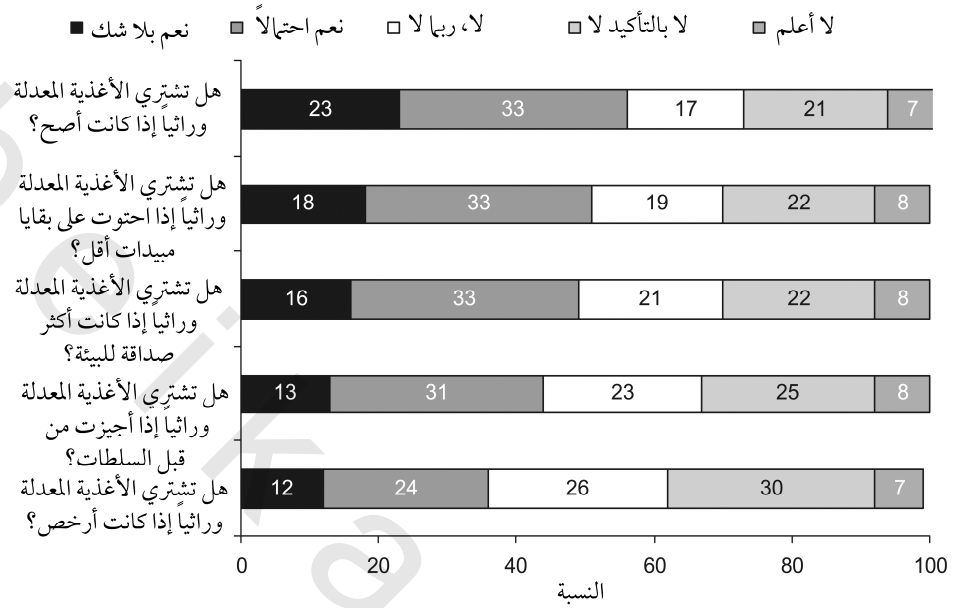
يمكن أن يقال بشدة إن رد الفعل تجاه التصورات العامة السلبية لا يوفر إجابة كافية. أولاً، ذكر سابقاً عدد من علماء الاجتماع مراراً أن دراسات التصور العام هي دراسات لمواقف المشاركين في الدراسة وأنه لا يمكن استقرائها في السلوك [٨-١٢]. وقد تم تدعيم ذلك في الآونة الأخيرة من خلال عدد من الدراسات على سلوك الشراء الفعلي للمستهلكين المقدمة على المنتجات الغذائية المعدلة وراثيا [١٣، ١٤].

ثانياً، لاتزال نتائج مسح اليوروباروميتر الأخير في عام ٢٠٠٥م، وأيضاً الدراسات (الوطنية) الأخرى تظهر دعماً كبيراً للمنتجات الغذائية المعدلة وراثياً (الشكل رقم ١٤,٤) [٣، ١٥، ١٦]. ففي عام ٢٠٠٥م أيد ٤٣٪ من سكان الاتحاد الأوروبي المنتجات الغذائية المعدلة وراثياً. وإذا كانت المنتجات الغذائية المعدلة وراثياً أكثر صحة، فسوف يشتري حتى ٥٦٪ بصورةٍ مؤكدة أو ربما هذه المنتجات. ومن المثير للاهتمام، أن نتيجة الأغذية الأرخص قد أظهرت أن مجرد ٥٦٪ لن أو ربما لن يشترون الأغذية المعدلة وراثياً لو كانت أرخص. وتدعم هذه النتيجة الأخيرة وجهة النظر القائلة بأن استطلاعات الرأي لا يمكن أخذها كقيمة وجيهة في السلوكيات. وقد اقترح جاسكل وآخرون [٣] أن بعض المشاركين يتفاعلون كمواطنين بدلاً من مستهلكين، كما يشير الاقتصاد إلى أن السعر هو المحدد الرئيس في خيارات الشعب.

وثمة نقطة أخرى مثيرة للاهتمام وهي أن السعر هو الحقيقة الوحيدة التي يستطيع المستهلكون في الواقع تأكيد أنفسهم مباشرة نحوها. وبالنسبة لجميع الفئات الأخرى فإنهم يحتاجون إلى الثقة في بعض المنظمات (السلطة،

(٨) تقرير إنترانس فوود النهائي المتوفر في: http//www.entransfood.nl/.

والصناعة، والبحوث الطبية) للحصول على معلومات الأغذية. وأياً ما كان السبب، فإن هذا يسلط الضوء على الشكوك حول استطلاعات الرأي كمؤشرات للسلوك الفعلي.



الشكل رقم (٤, ١٤). نسبة المواطنين الأوروبيين المستعدين لشراء المنتجات الغذائية المعدلة وراثياً ذات الخصائص المعينة. جاسكل وآخرون [٣]، دراسات يوروباروميتر متوفرة في:

http://www.ec.europa.eu/research/press/2006/pdf/pr1906_eb_64_ 3_final_report-may2006_en.pdf.

ثالثاً، وربما الأكثر إقناعاً، ظلت مبيعات المنتجات الموصوفة بأنها معدلة وراثياً ثابتة (تأكيد شفوي من سلسلة محلات بيع كبيرة). ورغم عدم وجود انخفاض في المبيعات، فإن شركات الأغذية تواصل استبدال المكونات المعدلة وراثياً للمنتجات بغير المعدلة وراثياً. على سبيل المثال، كان في هولندا أكثر من ١٢٠ منتجاً بمكونات معدلة وراثياً ذات علامات (اختيارية) في عام ١٩٩٩م. وقد انخفض هذا العدد بحلول عام ٢٠٠٧م إلى ١٩ [٥٣].

وتشير هذه الاعتبارات بقوة إلى أن شركات الأغذية ومحلات البيع استبدلت منتجاتها المعدلة وراثياً؛ لأنهم كانوا يخشون من الإجراءات العاطفية للمجموعات البيئية بدلاً من تأثرها بقلة عدد الناس الذين يشترون الأغذية المعدلة وراثياً أو محاولة حماية الناس من المخاطر الافتراضية. استجابت شركات المواد الغذائية لتمثيل أقلية من المستهلكين ووسائل الإعلام المصاحبة، وقد أدى هذا إلى وقف فعال في تطوير منتجات غذائية أرخص وأكثر استدامة أو صحة.

ما الذي يمكن عمله لتسهيل إدخال مستدام ومقبول لتطبيقات التقنية الحيوية الصناعية؟ لقد تعلمنا من دراسات التصور، وردود فعل العلماء، والصناعات، والحكومات بعض الدروس حول التواصل.

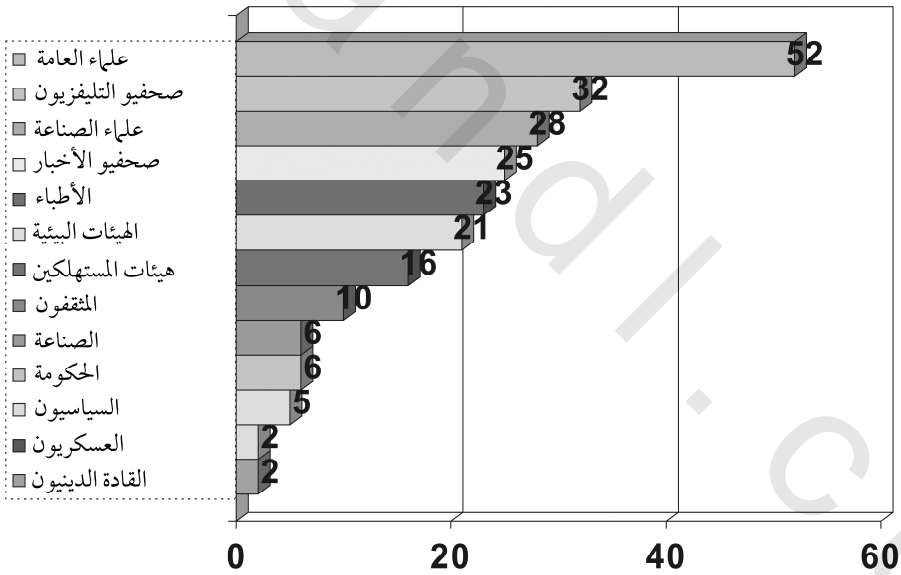
(١٤,٣,٤) تطوير التفاعل العام Development of Public Interaction

بالنظر إلى الوراء على مدى السنوات بدايةً من مسح اليوروباروميتر الأول في عام ١٩٩١م على التقنية الحيوية يمكننا تقييم مدى تأثير النتائج على السياسيين والعلماء، والصناعات. وأظهرت إحدى نتائج دراسات اليوروباروميتر الأولى هذه أن الجمهور في جميع أنحاء أوروبا لديه القليل جداً من المعرفة عن التقنية الحيوية وأشارت إلى أن المعرفة ترتبط بالدعم. وكانت النتيجة أن السياسيين وعلماء التقنية الحيوية بدأوا حملات إعلامية وتثقيفية لتثقيف الجمهور، بهدف زيادة الدعم لتطبيقات التقنية الحيوية في بداية تسعينيات القرن الماضي. واستند هذا التواصل من طرفٍ واحد على الاعتقاد أنه إذا تم توفير المزيد من المعلومات فإن الرأي العام سوف يفهم الفوائد المحتملة ويزيد من دعمه للتقنية الحيوية. وهذا هو مثال جيد لما يسمى بـ"نموذج العجز" للتواصل العلمي. ومع ذلك سرعان ما ظهر أن الكتيبات والوريقات والمحاضرات والبرامج التعليمية، ...إلخ لا تزيد بالضرورة من الدعم [١٧-٢٠]. وأصبح من الواضح أن كثرة المعلومات تميل إلى أن تؤدي إلى مزيدٍ من الاستقطاب في الرأي، سواءً بشكلٍ إيجابي أو سلبي.

في دراسة اليوروباروميتر للتقنية الحيوية عام ١٩٩٦م تم دعوة مجموعة من خبراء التواصل العلمي للمساعدة في الحصول على فهمٍ أوضح للتصور العام. وقد اختار علماء الاجتماع "استخدام التصور"، "خطر"، و"القبول الأخلاقي" كمحددات لتأييد الرأي العام. وطلب من الناس تحديد ما إذا كانوا يعتقدون أن كلاً من ستة تطبيقات للتقنية الحيوية مفيداً، أو محفوفاً بالمخاطر، أو مقبولاً أخلاقياً وإذا ما كان ينبغي تشجيعها. أدت النتائج إلى استنتاج مفاده أن الاستفادة هي شرط مسبق للدعم وأنها بأي حال من الأحوال دعم "غير مفيد" للتطبيق. على سبيل المثال، فإن المنتجات الغذائية المعدلة وراثياً التي تشبه الغذاء "العادي" ولكن ذات تكلفة إنتاج أقل من غير المحتمل أن تكون مقبولة. وسوف يتقبل الناس بعض المخاطر إذا كان التطبيق مفيد ومقبول من الناحية الأخلاقية. على سبيل المثال، من المرجح أن تكون الأغذية المعدلة وراثياً المحتوية على لقاح مهم أو أدوية جديدة المنتجة من الخميرة مقبولة. وعملت المخاوف الأخلاقية، مع ذلك، كحق النقض بغض النظر عن وجهات النظر حول المخاطر والاستخدام. ويتضح ذلك من الإحجام الظاهر في إنتاج الأدوية عن طريق الحيوانات المعدلة وراثياً. وكان الدرس الرئيس من الدراسة هو الاستنتاج بأنه "إذا كان الخطر أقل أهمية من القبول الأخلاقي، فإنه من غير المرجح أن تخفف التطمينات التقنية ومبادرات السياسة الأخرى التي تتعامل فقط مع المخاطر من مخاوف الجمهور" [١٩].

وقد تحول التركيز على التواصل بالتأكيد لإظهار فوائد التقنية الجديدة وزادت البحوث لتقييم المخاطر وتواصل المخاطر، وتصور المخاطر [٢١-٢٤]. وأظهر آدامز أنه عندما لا يمكن السيطرة على المخاطر من قبل الأفراد وتكون ملتبسة، على سبيل المثال نتيجة لعدم التيقن العلمي، فإن الثقة تقل ويتحفز تزايد طلب التنظيم. لذلك ما هي المنظمات الأكثر ثقة لتقديم المعلومات عن تأثير العلم والتقنية؟

وكما يبين الشكل رقم (٥, ١٤)، تعتقد الشعوب الأوروبية أن علماء العامة هم الأجدر لشرح آثار العلوم والتقنية على المجتمع وأن العلماء العاملين في الصناعة فقط يكونون أقل من ذلك. واتضح أيضاً حالياً وعلى نطاقٍ واسع أن القبول لا يمكن تحقيقه عن طريق توفير المعلومات ببساطة فقط. فلا يجب أن يكون دور العلماء فقط في اللعب ولكن أيضاً في الاستماع إلي، والفهم والرد على مخاوف العامة الفعلية. وكان رد فعل علماء الاجتماع والسياسيين، والصناعة هو إعادة تطوير نماذج التواصل، والتي تتميز بتطوير نموذج للحوار يسمى نموذج الحالة (٢) ونموذج المشاركة الأولية للاتصال [٢٥-٢٨]. وقد تم الدفاع عن نماذج تواصل استطرادية من قبل الرواد مثل شيرشمان وريتيل [٢٩]، وقد انتعشت هذه الأساليب في السنوات القليلة الماضية [٣٠، ٣١].



الشكل رقم (٥, ١٤). استجابات المواطنين الأوروبيين إلى "من هو الأجدر لشرح آثار العلوم والتقنية على المجتمع؟" جاسكل وآخرون [٣]، دراسات يوروباروميتر متوفرة في:

http://www.ec.europa.eu/research/press/2006/pdf/pr1906_eb_64_ 3_final_report-may2006_en.pdf.

بدأت اللجان الحكومية التي تقدم المشورة بشأن تدابير السياسة لتطوير التقنيات في الإشارة إلى تورط العلماء [٣٢-٣٥]. وقد ازداد الضغط على العلماء المشاركين في التواصل العام من جانب متطلبات النشر

والتواصل العام في المشاريع البحثية المحلية (الدولية) الممولة. وعلى نحوٍ متزايد، تتضمن معايير المشروع نشر النتائج على جمهورٍ أوسع نطاقاً، تليها المشاركة النشطة من جانب أصحاب المصلحة ومطالب الحوارات العامة. وينظر الآن إلى هذه الأشكال من التواصل "الاستباقي" على أنها حاسمة لإنفاذ التقنيات الجديدة.

(١٤, ٤) قضايا مجتمعية في التقنية الحيوية الصناعية Social Issues in Industrial Biotechnology

إن الدروس المستفادة من جدال التقنية الحيوية واضحة؛ يحتاج العلماء إلى المشاركة في التواصل العام ويحتاج مثل هذا التواصل لمعالجة القضايا المجتمعية، وإشراك أصحاب المصلحة، ...إلخ. وتم تنفيذ الكثير من المشاريع الممولة خصيصاً على مر السنين لاستكشاف دور العلماء والإعلام والصناعة ومناقشة "أفضل الممارسات" [٢٠، ٣٦]. وقد تم تطوير دورات تدريبية[٩] [٣٧] وإعادة النظر في المناهج لعلماء المستقبل. ولكن ما هي معايير أشكال التواصل هذه؟

(١٤, ٤, ١) معايير التواصل Criteria for Communication

لقد خلص الكثير من الأكاديميين والصناعيين إلى أن علماء التقنية الحيوية يحتاجون إلى زيادة مشاركتهم في التواصل العام لتحقيق مزيد من الدعم. ومع ذلك، فإن هناك أسباباً أخرى أكثر إلحاحاً للاهتمام بالتواصل. بغض النظر عن هذه الرغبة لزيادة القبول، فإن هذه الأسباب تستمد مباشرة من مبادئ المجتمع الديمقراطي. وتحتاج مشاركة الجمهور في عمليات صنع القرار إلى المعلومات العامة ويتطلب العقد الاجتماعي بين المجتمع والمعاهد العلمية المسائلة. بناءً على هذه الحجج التي تطرحها التطورات الحالية في المجتمع والتقنية الحيوية وإمكانية تأثيرها المهم، فإنه يمكن اشتقاق مجموعة من معايير التقييم للتواصل العام [٢٠].

تخضع البرامج السياسية والقرارات لآراء الناخبين. ولذلك فمن الضروري أن تتم مسائلة العلماء أمام الجمهور عن علمهم وأسباب قيامهم بذلك حتى يمكن اتخاذ القرارات المستنيرة. وعلى العلماء أيضاً واجب أخلاقي يتمثل في التواصل مع الجمهور حيث إنهم هم فقط الذين لديهم الفهم في المرحلة المبكرة للآثار المحتملة لعلومهم من أجل المجتمع، والذي يجب أن يوفروه لعملية صنع القرار المشتركة. وغالباً ما يؤدي تعقد التقنيات الجديدة إلى رفض الشعب للتقنيات الجديدة ولكن حيث إن الناس في النظام الديمقراطي يجب أن يكونوا قادرين على وزن الإيجابيات

(٩) عدد من الدورات تستهدف العلماء والصناعيين، مثل تلك التي نظمت بواسطة قوة العمل الأوروبية للتصور العام (دورة متقدمة في الاتحاد الأوروبي على الأخلاقيات الحيوية والمفاهيم العامة؛ اعتمدت في وقتٍ لاحق بالدورة المتقدمة لمركز كلوفير عن الاتصالات الإستراتيجية في التقنية الحيوية)؛ المركز الهولندي للمجتمع وعلم الجينومات؛ منظمة البيولوجيا الجزيئية الأوروبية؛ ويلكوم ترست.

obeikandl.com

والسلبيات بأنفسهم فإنه هناك أيضاً واجب اجتماعي على العلماء لتوفير هذا الفهم. وعلاوةً على ذلك، إذا تم التعاقد مع العلماء من قبل المجتمع لوضع الحلول لتحديات الغد، فإن يجب على المجتمع أن يكون قادراً على الثقة بهم. تقوم الثقة بدور جهاز التلخيص عندما لا يكون الفهم الكامل ممكناً. هذا هو الوضع العام للتقنيات الحديثة، وخاصةً بالنسبة لتعقيدات التقنية الحيوية. وتستند الثقة على الإيمان والمعرفة والتي يدعى أنه يحافظ عليها عن طريق الشمولية، والشفافية، والمعلومات. وهذا يتعلق بالمعلومات الواقعية والمشاعر العاطفية على حدٍ سواء.

والمساءلة هي مكون للعقد والثقة [٣٨]. ويتم التعاقد مع العلماء ودفع رواتب عملهم من قبل المجتمع عن طريق فرض الضرائب والحكومة. وهم مسؤولون أمام المجتمع عن استخدامات ونتائج هذه الرواتب. والحاجة الاجتماعية لمسائلة العلماء ومن ثم الحفاظ على الثقة، هي أمر حتمي يترتب على العقد بين المجتمع والعلوم.

هناك أيضاً أسباب اقتصادية لتواصل العلماء مع الجمهور. يتعلق السبب الأول بحقيقة أن توليد الثروة لعمل المجتمعات الحديثة يعتمد كلياً على العلم والتقنية. وقد تم الترويج للتقنية الحيوية باعتبارها مولد رئيس للثروة. من أجل السماح للمجتمع بصنع قرارات مستنيرة بشأن مساهمة التقنية الحيوية التي تقدمها لإنتاج الثروة، فإن العلماء يحتاجون لشرح آثارها الاقتصادية، أي فوائدها، وتكاليفها للمجتمع. ويشمل هذا أيضاً شرح التكاليف والفوائد للمجتمع إذا لم يتم اتباع تقنية مجدية علمياً. السبب الاقتصادي الثاني هو أن العلماء يجب أن يفسروا لماذا يجب على المجتمع إعادة بعضاً من الثروة التي تم إنشاؤها بواسطة العلم للعلم حتى يمكن للعلم وتوليد الثروة أن يستمروا. حيث إن المجتمع يدفع للجامعات ومعاهد البحوث الممولة من القطاع العام، فإنه من مصلحة جميع الأكاديميين أن يتواصلوا عن عملهم. ويقرر المجتمع كمية وتوزيع التمويل العام استناداً إلى هذه المعلومات. ومع ذلك، ومع الطلبات المتنافسة على التمويل العام المحدود فإنه من مصلحة علماء التقنية الحيوية ذاتهم، كما هو الحال مع أعضاء جميع التخصصات الأكاديمية، أن يتواصلوا بصورةٍ فعالة.

وتستند المناقشة السابقة على وجهة نظر مثالية للديمقراطية مع كامل إشراك الجمهور في عملية صنع القرار. ومع ذلك، فإن الواقع في المجتمعات الديمقراطية هو أن معظم الناس ببساطة لا ترغب في المشاركة في صنع القرار، والذي يترك للممثلين المنتخبين والموظفين التابعين لهم. وهم بدورهم يميلون إلى التأثر بالآراء التواصلية والتصورات العامة المتصورة في حين يتعرضوا لضغوط شديدة في كثيرٍ من الأحيان من جماعات المصالح الخاصة، على الرغم من أنهم مسؤولون في النهاية أمام الناخبين. لذلك تظل الحقيقة هي أنه يتم إعلام "الأغلبية الصامتة" من عامة الجمهور. ومن أجل الوصول إلى هذه "الأغلبية الصامتة"، تحتاج أنشطة التواصل العام إلى تحفيز اهتمام الجمهور. وحيث إن المجموعات المختلفة من الناس لديها مصالح ومخاوف مختلفة متنافسة فإنه من الضروري أيضاً أن نعرف ونفهم مصالحهم ومخاوفهم المختلفة. ولا تتعلق هذه فقط بالمعلومات العلمية والتقنية، ولكن أيضاً

وبصورةٍ أهم بالقضايا الأخلاقية الحيوية، ومسائل السلامة، والاجتماعية، والقانونية. يجب أن يكون العلماء قادرين على الفهم والاستجابة لهذه القضايا.

بناءً على العقد الديمقراطي للعلوم مع المجتمع، فإن هذه الأسباب الاجتماعية، والأخلاقية، والاقتصادية توجب على العلماء الإعلام والمشاركة في عملية صنع القرار الديمقراطي التي تشمل التفاعل مع الجمهور. وكما هو الحال في أي عقد، فإن الأداء الجيد يكون في مصلحة المؤدي. وتتم المجادلة بأن التواصل هو مهمة ضمنية للعلماء، وعليه فإنه من مصلحتهم الخاصة القيام بذلك على نحوٍ فعال ومن مصلحة المؤسسات الأكاديمية تسهيل وتنظيم هذه العملية.

من الحجج المذكورة أعلاه يمكن أن نخلص إلى أن التواصل العام يرتبط بما يلي:

- توافر المعرفة (المعلومات عن البيانات العلمية؛ والمعلومات عن التأثير المحتمل لتنفيذ التقنيات المستمدة في المجتمع والمعلومات عن كيفية صنع الأحكام أو كيفية التأثير فيها).
- توافر مهارات التفاعل.
- توافر السلوك (لتشجيع المصلحة العامة والاستجابة لمصالح ومخاوف الجمهور).

تؤدي هذه المتطلبات إلى معايير تواصل العلماء التي يلخصها الجدول رقم (١ , ١٤).

الجدول رقم (١ , ١٤). معايير تواصل العلماء المستمدة من الأسباب الاجتماعية، والأخلاقية، والاقتصادية للتواصل كشركاء في العقد بين العلم والمجتمع [٢٠].

المعايير للتواصل العام من قبل العلماء لاحاطة عملية اتخاذ القرار:
شرح العلوم
شرح التأثير
بناء الثقة
الاستماع والاستجابة للمخاوف الأخلاقية والقانونية والاجتماعية
أكبر قدر ممكن من الفائدة
التكيف مع التغيرات في المجتمع

(٢ , ٤ , ١٤) أساليب جديدة للتواصل Novel Approaches for Communication

يحتاج تطبيق هذه المعايير لتواصل العلم إلى أشكال جديدة للتواصل. وعلى قدرٍ كبيرٍ من الأهمية يجب أن يكون التفاعل متبادلاً (أو في اتجاهين) وهو ما يتطلب الاستعداد للاستماع والفهم لحجج بعضهم من قبل كلٍ من

المرسل والمتلقي. وليس من السهل أن يتحقق هذا، وخصوصاً عندما نود أن نوجد حواراً بهدف الحل. وعليه تنقب بحوث الأشكال الجديدة من التواصل عن نماذج ذات اهتمام خاص بالتحديث (على سبيل المثال التركيز على احترام تناظر الجهل والذي اقترح أنه يؤدي إلى ديناميكيات تعلم متدرجة منتظمة [٣٩، ٤٠] وعلى طرق لزيادة مشاركة أصحاب المصلحة [٤١-٤٣] وعلى الوصول إلى الأغلبية العامة "غير المهتمة" من خلال الترفيه والعاطفة [٤٤، ٤٥]).

ليس هناك شك في أن التحول نحو المجتمع القائم على المصادر الحيوية هو مشكلة تصميم معقدة للغاية، الأمر الذي يتطلب المزيد من المعرفة والإبداع أكثر من التي يمكن أن يمتلكها شخص واحد للوصول إلى المصالحة في وجهات النظر. وحيث إننا أيضاً نسعى جاهدين لإجراء تغييرات في سلوك المستهلك، فإنه من المهم أن ندمج برامج التقنية المستدامة وتطوير المنتجات مع البرامج التي تركز على التغيرات في المواقف والسلوك [٤٦]، وعليه في مجال التواصل. وسوف تعطي دراسة الحالة التالية لمركز كلوفير لعلم جينومات التخمير الصناعي مثالاً على هذا النهج.

(٣, ٤, ١٤) ثلاث حلقات عمل دولية لتعريف القضايا المستقبلية في التقنية الحيوية الصناعية: دراسة حالة

Three International Workshops Identifying Future Issues in Industrial Biotechnology: A Case Study

إن أحد التحديات الأكثر أهمية وربما صعوبة للسياسيين في الوقت الحاضر هو فهم المخاوف الأخلاقية والقانونية، والاجتماعية في المجتمع. ومن أجل أن نقدر تماماً القضايا المجتمعية ذات الصلة لتطبيقات التقنية الحيوية الصناعية فإننا بحاجة إلى فهم نظم القيم في مجتمعنا (المتغير)، وتحديد أصحاب المصلحة في الحاضر والمستقبل، وكشف القضايا العامة والسياسية في القضايا التنظيمية، والأخلاقية والاقتصادية ومسائل السلامة. ونحن نحتاج أيضاً إلى فهم أدوار ومسؤوليات جميع أصحاب المصلحة بحيث نستطيع تحديد المنظمات التي يمكن أن تكون مسؤولة عن معالجة هذه القضايا.

قام مركز الشراكة العامة الخاصة الهولندي "مركز كلوفير لعلم جينومات التخمر الصناعي"[١٠] بإجراء سلسلة من ثلاث حلقات عمل دولية لتحديد وفهم وتحليل القضايا المجتمعية المستقبلية المحتملة في التقنية الحيوية الصناعية. تشكل ورش العمل جزءاً من برنامج المركز لعلم الجينومات والمجتمع، وكانت تستهدف تبليغ تطور أنشطة التواصل الحديثة (للحصول على الحساب الكامل، انظر المرجع [٤٧]). وجمعت حلقات العمل ٢٥ خبيراً من مختلف التخصصات والانتماءات (مثل الأخلاقيات وعلم الأحياء المجهرية وعلوم المواد الغذائية وتصور المخاطر، والإدارة الثقافية من الأوساط الأكاديمية، والصناعية، والحكومية، والمفوضية الأوروبية، ...إلخ)

(١٠) مركز تميز ممول من الحكومة، لمزيد من المعلومات انظر http://www.kluyvercentre.nl.

وهدفت أيضاً إلى وضع إستراتيجية منسقة للحوار العام. وبحث الاجتماع الأول الاتجاهات العلمية في التقنية الحيوية الصناعية وقضاياها المجتمعية المرتبطة. وهدفت الدورة الثانية إلى تعريف المنظمات المعنية والمسؤولة لمعالجة هذه المخاوف العامة. ونص الاجتماع الثالث والأخير على اقتراح طرق جديدة للتواصل وأوصي بجدول أعمال مشترك لهذا النهج.

في اجتماعهم الأول في عام ٢٠٠٤م، ربط فريق الخبراء الاتجاهات العلمية مثل الأطعمة الصحية والشخصية، والمواد الحيوية الجديدة والوقود الحيوي مع الحوافز السياسية للتقنية الحيوية الصناعية، والمخاوف بشأن الإفراط في التنظيم وقلة وعي العامة وأيضاً قبولهم المعروف للاستخدام المعزول للكائنات الحية الدقيقة. وعلى هذا الأساس عرفوا القضايا "المستقبلية" التالية:

- السلامة، بما في ذلك الأسئلة مثل تلك المتعلقة بتلوث منتجات الأغذية بالنباتات المنتجة للأدوية المتعايشة مع المحاصيل الغذائية.
- استخدام الأراضي مع تضاربات الغذاء والطاقة، وارتفاع أسعار المواد الغذائية وفقدان الغابات المطيرة.
- علم الطاقة والكفاءة البيئية والتشكيك في الأدلة المقدمة في هذا المسألة المعقدة مما يؤدي إلى مخاوف من الثقة.
- الضغوط البيئية، بما في ذلك المخاوف على التنوع الحيوي؛ واستنزاف التربة، وقيود المياه، والزراعات الأحادية.
- الجدوى الاقتصادية فيما يتعلق بالاعتماد على النفط وأسعار السكر المرتبطة بها وعدم اليقين الناتج للاستثمار الصناعي.

وقد حدد الاجتماع الثاني في عام ٢٠٠٥م الحواجز الرئيسة كالتأهب للتصرف؛ والمصالح الاقتصادية لأصحاب المصلحة، وتنسيق جداول الأعمال، والوضوح في الأنظمة والحوافز. وأوصى المشاركون بتوضيح مفهوم الاستدامة والبحث عن سبل جديدة للتفاعل لإثارة اهتمام العامة. بالإضافة إلى ذلك فقد أوصوا ببناء الثقة من خلال إظهار المسؤولية (والتأهب للتصرف) وإشراك وتدريب شباب العلماء في التعامل مع هذا.

على الرغم من أن الكثير من القضايا المذكورة أعلاه كان ينظر إليها على أنها تستحق مزيداً من التنقيب، قررت المجموعة أن تركز على الوقود الحيوي والاستدامة في اجتماعها النهائي في عام ٢٠٠٦م. وأخذوا الاستدامة باعتبارها "قيمة أساسية" واقترحوا جدول أعمال مشترك لأصحاب المصلحة الرئيسين؛ وذلك بهدف الحد من استخدام الطاقة والمصادر الحفرية مع زيادة استخدام المصادر المستدامة مثل الكتلة الحيوية (الشكل رقم ٦, ١٤). وسوف يوصل هذا النهج الإجماعي رسالة واحدة للجمهور، وبموجب اتفاق مشترك، ولكن في الوقت نفسه

سوف يسمح للمنظمات بأن تظل وفية لمصالحها، ومساهميها، أو دوائرها الانتخابية. عند اعتبار الاستدامة قيمة جوهرية، يمكن أن تركز الأوساط الأكاديمية والصناعية على زيادة الابتكار باستخدام التقنية الحيوية الصناعية. ويمكن للمنظمات غير الحكومية التأكيد على أهمية الحد من استخدام الطاقة والتلوث. ويمكن للحكومات تطوير إجراءات لتحفيز كلاً من زيادة الابتكار وانخفاض استخدام الطاقة والتلوث.



الشكل رقم (٦, ١٤). توصيات مجموعة الخبراء الدولية في ورشة عمل مركز كلوفير حول القضايا المستقبلية في مجال التقنية الحيوية الصناعية، بروكسل، يونيو ٢٠٠٦م.

كان من المسلم به أن اعتماد هذا البرنامج المشترك سوف يحتاج إلى مزيد من المناقشة مع أصحاب المصلحة. ولذلك اقترح أن تقوم المنظمات "المحايدة" مثل هيئات الحكم المحلي والمفوضية الأوروبية بعقد اجتماعات مع أصحاب المصلحة. يجب أن تهدف هذه الاجتماعات إلى المناقشة العلنية للمصالح الاقتصادية، والقيم وعلاقات الثقة من أجل زيادة فهم اختلاف وجهات النظر وتقليل تطوير التصورات الخاطئة. وأوصى الخبراء أيضاً بأن السياسيين ينبغي أن يركزوا على إزالة العقبات بهدف إنشاء تنظيم موحد. ويجب أن يركزوا أيضاً على تطوير الإجراءات التشجيعية الواضحة. وأخيراً وليس آخراً، كانت التوصية بزيادة الأبحاث على تطوير أشكال جديدة من تواصل الجمهور مع إيلاء اهتمام خاص لزيادة مستوى مشاركة ومسؤولية المواطنين. ومن المثير للاهتمام أن نرى أن هذه التوقعات للقضايا المستقبلية المحتملة لفريق الخبراء هذا في يونيو ٢٠٠٦م هي التي تناقش حالياً في وسائل الإعلام (خريف ٢٠٠٧م). ولكن ما الذي تستلزمه؟

(٤, ٤, ١٤) مزيد من تحليل القضايا المجتمعية المحددة المتعلقة بالتقنية الحيوية الصناعية

Further Analysis of the Identified Societal Issues Related to Industrial Biotechnology

القضية الأولى، السلامة، هي ظاهرة معروفة جداً في مجتمعنا البغيض ذو المخاطر اليومية. وعلى الرغم من أنها تقدم نفسها على أنها مصدر قلق رشيد ومعقول إلا أنها في الواقع شيء أكثر من ذلك بكثير. بادئ ذي بدء، يدعي الكثير من العلماء أنه لا يوجد أساس علمي منطقي معروف للقلق. ويقولون إن التخمير هو شيء قد استخدم لعدة قرون وأن تطبيق تقنيات التعديل الوراثي يوفر طريقة أكثر دقة من أي تقنية سابقة تستخدم لتحسين الكائنات الحية الدقيقة. وحتى الآن لم تظهر الكثير من الدراسات على تقييم المخاطر أي خطر كبير للهندسة الصناعية في التقنية الحيوية حيث يتم اتباع الإجراءات الاحترازية المنظمة. فإننا لم نشاهد أي حادث كبير منذ إدخال الكائنات الحية الدقيقة الصناعية المعدلة وراثياً خلال السنوات الثلاثين الماضية. وعلاوةً على ذلك، فإن هناك تشريعات قوية وصارمة. وتعتمد سلامة الكائنات المعدلة وراثياً المستخدمة في التقنية الحيوية الصناعية على خصائص الكائن الحي وتفاعله مع البيئة التي يتم إطلاقه فيها (عن طريق الخطأ). وتتطلب تشريعات السلامة عموماً تحليل المخاطر التي يمكن أن تحدد وتقيم الآثار الضارة المحتملة للكائنات المعدلة وراثياً. ويتم اختيار الكائنات المضيفة لقدرتها على إنتاج المنتج المطلوب ولكن أيضاً لقدرتها على النمو خارج وحدة الإنتاج. وإذا تم اطلاق الكائنات (الدقيقة) المعدلة وراثياً للتطبيقات في البيئة، فإنه يلزم اتخاذ مزيد من تدابير السلامة للحد من الآثار السلبية على صحة الإنسان والبيئة.

فرض استخدام مبدأ الحيطة نهجاً صارماً للغاية للسلامة في أوروبا. ويتم تقديم تعريف للتحوط في وثيقة اليونسكو *المبدأ الوقائي*، التي نشرتها اللجنة العالمية المعنية بأخلاقيات المعرفة العلمية والتقنية (COMEST) في عام ٢٠٠٥م. وتمت طباعة المبدأ الوقائي لمنظمة لأمم المتحدة للتربية والعلوم والثقافة في فرنسا :SHS-2005/WS/21 cld/d 20/5/

> عندما قد تؤدي الأنشطة البشرية إلى أضرار غير مقبولة أخلاقياً وهذا معقول علمياً ولكنه غير مؤكد، فسوف تتخذ الإجراءات لتجنب أو تقليل ذلك الضرر.
>
> تشير الأضرار غير المقبولة أخلاقياً إلى الضرر بالنسبة للإنسان أو البيئة أي
>
> - تهديد حياة أو صحة الإنسان.
> - خطيرة ولا رجعة فيها بشكلٍ فعال.
> - ظالمة للأجيال الحالية أو المستقبلية.
> - تم فرضها دون الاهتمام الكافي لحقوق الإنسان بالنسبة لهؤلاء المتأثرين.

openkandi.com

وينبغي منع الحكم على المعقولية في التحليل العلمي. ويجب أن يكون التحليل مستمراً بحيث تخضع الإجراءات المختارة للمراجعة. وقد ينطبق عدم اليقين، ولكن ليس من الضروري أن يقتصر، على السببية أو حدود الأضرار المحتملة.

الإجراءات هي التدخلات التي تجري قبل أن يحدث الضرر والتي تسعى إلى تجنب أو تقليل الضرر. وينبغي اختيار الإجراءات التي تتناسب مع خطورة الضرر المحتمل، مع أخذ عواقبها الإيجابية والسلبية في الاعتبار مع تقييم الآثار الأخلاقية المترتبة على حدٍ سواء على الفعل وعدم الفعل. وينبغي أن يكون اختيار الفعل نتيجة لعملية تشاركية.

وتطلب الشركات، والحكومات بصورة متزايدة، الآن تحرير بعض التطبيقات بما في ذلك التقنية الحيوية الصناعية، حيث ينظر للوضع الحالي على أنه يلحق الضرر بالنمو الاقتصادي. ويشير الكثير من مؤيدي التقنية الحيوية إلى أن تقييم المخاطر المطلوب لا يتضمن تقييم المخاطر النسبية للعمليات، والمنتجات، أو الممارسات القائمة. بالإضافة إلى ذلك فإن هناك نقاشاً بين المنظمين حول إلغاء تنظيم العمليات التي تستخدم تقنيات التعديل الوراثي حين لا يحتوي المنتج على أي تعديل وراثي. ويدعي آخرون أن إدراج تقييم للفوائد المحتملة للابتكار المقترح يمكن أن يخلق حافزاً للابتكار المفيد.

ويعتمد طلب تحرير التنظيم على مستوى حساس ذو ضرورة محددة للحفاظ على الثقة. وقد أظهرت دراسات تصور المخاطر، مثل تلك التي تمت بواسطة آدامز ([٢٢]، انظر أيضاً [٤٨]) أن المخاوف تزيد وتصبح أقل اعتماداً على العقلانية عندما لا يتعرف الناس على الخطر الفعلي للتقنية أو المواد أو عندما لا يكون لديهم السيطرة على استخدامها بأنفسهم. وثمة من يقول، بالتالي، أن المخاوف العامة المتعلقة بالسلامة هي أكثر عرضة لتظهر من قضية السيطرة. فمن الواضح أن أي شك علمي يعرب عنها في المجال العام سوف يزيد من مستوى القلق العام، بل والطلب على التنظيم. لكن يحتاج التنظيم إلى أن يتم السيطرة عليه من خلال شخص ما وهذا أيضاً هو السبب في كون الحفاظ على الثقة وبنائها قد ذكر كعاملاً حاسماً في ابتكار التقنية.

وقد أشار أونيل، مع ذلك، إلى أنه على الرغم من أن زيادة التنظيم وآليات الرقابة سترفع بلا شك من مصداقية النظام، إلا إنها لن تزيد بالضرورة من الثقة في الناس الذين ينفذون التقنية الحديثة [٤٩]. ونحن بحاجةٍ ماسة لمزيد من فهم هذه العلاقة وإيجاد طرق جديدة للتعامل مع حالة عدم اليقين العلمي ومع ردود الفعل الانفعالية العامة. ونحن تحتاج أيضاً إلى إيجاد السبل التي سوف تبني أو تحافظ على ثقة الجمهور ليس فقط في العلماء الذين يطورون التقنية (والذين سبق أن وثق بهم من قبل الجمهور، انظر الشكل رقم ٥, ١٤)، ولكن أيضاً في أولئك المسؤولين عن تنظيم ومراقبة استخداماتها في المجتمع.

أما القضية الثانية، استخدام الأراضي، فربما كانت الوحيدة التي تخلق أكثر الضجيج في الوقت الحاضر. وتتضمن التقارير الاعلامية الأخيرة عبارات انفعالية مثل "العار"، "الجريمة ضد الإنسانية"، و"لصوص الغذاء" في الهجوم على إنتاج الكتلة الحيوية للمواد غير الغذائية (عادةً الوقود الحيوي). ومن المثير للاهتمام، إن المقالات الإيجابية تجاه تطوير الوقود الحيوي تكون أقل انفعالية، ربما باستثناء آل جور وأنصاره في مطالباتهم بشأن استخدام هذه التقنيات ضد الاحتباس الحراري العالمي. في الخلاصة فإن "قضية الأرض" هذه هي قضية اقتصادية: فيجب أن يقرر أصحاب الأراضي ما سوف يزرعونه على أساس عائد الاستثمار. وقد تؤثر خياراتهم في أسعار المواد الغذائية، على سبيل المثال إذا قرروا زراعة محاصيل الطاقة غير الغذائية. ومع ذلك، فإنه سوف يكون من الصعب فصل تأثير استخدام الأراضي عن التأثير الكلي لزيادة الطلب على الكتلة الحيوية.

وهناك مجال أكثر انفعالية يعرب عنه في قضية استخدام الأراضي هذه وهو فقدان الغابات المطيرة وخيارات المزارعين الفقراء في البلدان النامية لزراعة محاصيل الطاقة الحيوية بدلاً من المحاصيل الغذائية. فكما يشير البعض، فإن هذا قد يؤدي إلى مزيد من الأزمات الغذائية المحلية في البلدان التي تكافح بالفعل ولكن أيضاً في زيادة الدخل التي قد تمكنهم من استيراد الأغذية. ومن غير الواضح كيف سيتطور الاقتصاد وما الذي سوف يعمل بشكلٍ أفضل لمصلحة من.

وعلى الرغم من ذلك ، فإنه من المثير للاهتمام أن نرى كيف ترتبط قضية استخدام الأراضي هذه بالقلق الأخلاقي للقيمة الأساسية الأكبر من ذلك بكثير. في حين يبحث الناس في كثيرٍ من الأحيان عن زيادة السلامة مستهدفين المستوى الأعلى من الاستقلالية الفردية والاختيار، فإن قضية استخدام الأراضي هي في الواقع تستخدم لدعم أيديولوجية للجميع. وتتضمن الأيديولوجية القيم الأخلاقية المرتبطة برؤية للعالم الطبيعي وأيضاً بالقيم الديمقراطية والمساواة بين الناس في البلدان النامية والأقل نمواً، وحرية التعامل في البلدان الأقل نمواً.

على الرغم من أن نواياهم قد تكون حسنة بشكلٍ جيد للغاية، فإن هؤلاء من المجتمعات الغربية الذين لا يمتلكون أي أرض بأنفسهم هم عادةً الذين يكونون أكثر المعنيين بهذه القضايا الأخلاقية لاستخدام الأراضي. وقد تختلف قيمهم الأخلاقية حسنة النية عن هؤلاء الذين يعيشون في البلدان النامية، مما يؤدي إلى اتهامات "بالاستعمار الجديد". وقد حاولت بعض الدول أن تطور أنظمة للسيطرة على الاستخدام المستدام لأرضنا العالمية (تقرير كريمر، ٢٠٠٧م)[١١]. ومع ذلك فإنه من الضروري أن ندرك أن الناس في المجتمعات الغربية عموماً يكونون

(١١) مجموعة مشروع "الإنتاج المستدام للكتلة الحيوية" (٢٠٠٧م). اختبار اطار الكتلة الحيوية المستدامة. سينتيرنوريم، هوج، هولندا.

في أعلى مستوى في "هرم ماسلو"، حيث يتم استيفاء احتياجاتهم الأساسية من المياه والغذاء والسكن والرعاية الصحية والتعليم، والتوظيف. وهذا ليس هو الحال في البلدان النامية حيث لا يتم في بعض الأحيان استيفاء حتى المتطلبات الأساسية مثل الغذاء والسكن. والناس في هذه الظروف ليسوا قادرين على الاهتمام بالمسائل المتصلة بالمشكلات "الكمالية" للأجيال القادمة، مثل فقدان الغابات المطيرة أو ظاهرة الاحتباس الحراري [٥٠].

فمن المرجح، لذلك، أنه سوف يكون من الصعب تحقيق الاجماع حيث إن هؤلاء الأكثر استعداداً لتنفيذه يكونون بشكلٍ عام في وضع يجعلهم قادرين على تحمل هذا، في حين هؤلاء في البلدان النامية لديهم احتياجات أكثر إلحاحاً مما قد يثبت النتائج العكسية.

المسألة الثالثة هي علم الطاقة أو الكفاءة البيئية. يتم تنفيذ الكثير من دراسات التأثير في الوقت الحاضر لحساب البصمة البيئية من حيث إنتاج الطاقة والمواد مقابل المواد والطاقة المستخدمة في إطارٍ عالمي. وتهدف هذه النماذج للتنبؤ بأفضل المحاصيل لمنتج معين مطلوب ينتج بأفضل طريقة (معظمها مستدامة). وحيث إن الكثير من البيانات اللازمة للحساب هي غير مؤكدة ويختلف عدد المتغيرات المدرجة في الحساب، فإن النماذج تعطي نتائج مختلفة جداً. ويتم التشكيك في هذه النتائج بجدية من قبل العلماء، ورجال الصناعة، والمنظمات غير الحكومية في التقنية الحيوية (الصناعية والزراعية) المتصلين بهذه النماذج كمتنبئين للاستثمار في البحوث. وتتصل هذه المسألة لذلك بعدم اليقين في الأدلة والتحقيقات العلمية. وحيث إن نتائج هذه النماذج غالباً ما تستخدم في التفاعل العام "كدليل" من وجهة نظر معينة، فإنه يتم تضخيم مسألة عدم اليقين العلمي والأدلة الواقعية في الواقع. ويقوض هذا ثقة الجمهور في العلماء في قدرتهم على إنتاج "الحقائق العقلانية".

ويمكن أيضاً تصور المناقشة الساخنة حول صحة البيانات بواسطة العامة بطريقةٍ مختلفة، أي أن أطراف النقاش يختارون ويستخدمون "الحقائق" التي تناسبهم أكثر؛ لأن لديهم مصلحة (اقتصادية) والتي يرغبون أن تمضي قدماً. وقد يؤدي مثل هذا التصور إلى زيادة انخفاض علاقات الثقة وزيادة قلق الرأي العام من هذه التقنية. ويحتاج تأثير حالة عدم اليقين العلمي من الأدلة والتحقيق العلمي، والثقة، وتصورات أصحاب المصلحة على قلق الرأي العام وتطوير التقنية إلى مزيدٍ من الدراسة.

تبدو القضية الرابعة، وهي الضغوط البيئية، على سبيل المثال نضوب المياه والتربة، مسألةً علميةً أخرى. ويمكن حلها في أقرب وقت عندما نعرف كيف نعمل في الأرض بطريقةٍ بحيث لا نستنفد أرضنا ونستخدم الكثير من المياه ونمنع فقدان التنوع الحيوي. وللحظةٍ ما يبدو هذا مرة أخرى كمصدر قلق من عدم اليقين العلمي بشأن أفضل طريقة للتعامل مع هذه المشكلة على المدى القصير بينما يتم تطوير الحلول على المدى الطويل وللمطالب الأكبر. ويتم استخدام إلغاء الحرث وإدخال المحاصيل المقاومة للجفاف كحلول ممكنة، ولكن يخشى البعض من

أنه لن يكون هناك ما يكفي من المياه لإنتاج مـجموع كمية المحاصيل اللازمة لاقتـصاد الكتلة الحيوية. وتتعـلق هذه المسألة كذلك بالتنوع الحيوي، والذي هو مصدر قلق يرتبط بالمحاصيل المعدلة وراثياً والزراعة الصناعية لسنواتٍ كثيرةٍ.

وغالباً ما ينظر للممارسات الزراعية الكبيرة باستخدام الزراعات الأحادية ومبيدات الأعشاب والمبيدات الحشرية على أنها تهديد لتنوع مملكة نباتاتنا العالمية (والحيوانية المرتبطة). وهناك حاجة للتنوع بوصفها مصدراً للصفات (الدنا) للتطبيقات المستقبلية في المحاصيل أو للمنتجات الصيدلانية. وتشمل المناطق الغنية في تنوع الأنواع الغابات المطيرة، ولكن ينظر أيضاً إلى المناطق في الظروف البيئية القاسية كمزودين مهمين للمادة الوراثية. وتم إنشاء بنوك للبذور في الوقت الحاضر للحفاظ على صفات المصادر النادرة أو المنقرضة تقريباً. ومع ذلك، فمن الواضح أن الصيانة في الموقع ستكون أفضل؛ لأنها سوف تسمح أيضاً بالمزيد من التطور وإنشاء خصائص جديدة. وقد يساعد الحد من مبيدات الأعشاب والمبيدات الحشرية عن طريق استخدام المحاصيل المعدلة وراثياً والانتقال إلى الممارسات الزراعية بدون الحرث أيضاً في الحفاظ على التنوع الحيوي.

ومع ذلك، فإن قضية التنوع الحيوي والضغوط البيئية ليست فقط علمية ولكنها تتعلق أيضاً في كثيرٍ من الأحيان برؤية أعمق للطبيعة الكامنة. وتشير الحجج المستخدمة في المناقشات الساخنة حول خسارة الفراشات الملكية في حقول الذرة المعدلة وراثياً [٥١] إلى أن هؤلاء المعنيين بالتنوع الحيوي غالباً ما يرفضون الحلول العلمية، ولكنهم يقترحون العودة إلى "الطريقة الأصلية الطبيعية" لإنتاج المحاصيل (كما هو الحال في ممارسات الزراعة العضوية). وتصبح هذه الآراء في كثيرٍ من الأحيان انفعالية في المناقشات الساخنة وتفقد عقلانيتها القائمة على العلم [٥٢].

والقضية الخامسة والأخيرة المعروضة هنا هي الجدوى الاقتصادية. ومن الواضح أنها قضية اقتصادية للصناعة المعنية وليست قضية عامة بالقدر نفسه. وهي تشير إلى صعوبة الصناعات للتحول إلى عمليات الإنتاج بالتقنية الحيوية الصناعية المستدامة. ومن أجل تحقيق ذلك، تحتاج الصناعات إلى الاستثمار في الابتكار، والقوى العاملة، والمعدات ولكن يجب أن تقرر بشأن هذه المسائل في بيئة من عدم اليقين. فأسعار النفط والمواد الأولية تتذبذب بعنف، ولا تزال الابتكارات في مرحلة التطوير (مثل الجيل الثاني من الوقود الحيوي)، في حين تظل الحوافز الحكومية غير واضحة ولاتزال اللوائح قيد المناقشة. ورغم أن الصناعات تكون واسعة الحيلة في خلق سبل لتحقيق التوازن بين هذه الشكوك ضد قيم المساهمين، فمن الواضح أن توضيح التنظيم والقرارات المتعلقة بالحوافز سوف يساعد على تسريع إدخال العمليات المستدامة.

(٥, ٤, ١٤) الدراسات وتقارير اللجان المتصلة الأخرى Other Relevant Studies and Committee Reports

لقد تطورت صناعة كاملة من اللجان الحكومية، العابرة للقارات متعددة التخصصات، ومتعددة أصحاب المصلحة منذ ثمانينيات القرن الماضي. وهي تعكس تغييراً في اتخاذ القرار الديمقراطي حيث إن كثيراً منها يشمل أطرافاً كثيرة في المناقشة مثل ممثلي منظمات المستهلكين والمرضى والمنظمات غير الحكومية، والأشخاص غير الخبراء، ...إلخ. وقد أنتج عدد من هذه اللجان تقارير مثيرة جداً للاهتمام، مثل تقرير اليونسكو عن المبدأ الوقائي (٢٠٠٥م) وتقرير لجنة التعديل الوراثي الهولندية (COGEM)[١٢] "نحو اطار متكامل لتقييم القضايا الاجتماعية والاخلاقية في التقنية الحيوية الحديثة" (٢٠٠٣م). ويوفر كلاً منهما تعريفاً واضحاً و/ أو إجراءات لتقييم الحالة الفنية للحكم على إنفاذ التقنية الحيوية في المجتمع. وقد أوصت دراسات أخرى بتوصيات عالية (مثل اللقاء التشاوري للاتحاد الأوروبي و الولايات المتحدة[١٣]، ٢٠٠٠م). ويقدم تقرير كريمر الأخير المبادئ التوجيهية للتنمية المستدامة للوقود الحيوي، ويهدف إلى تجنب استخدام الغابات المطيرة والطرق الأخرى الأقل استدامة.

وكلما زاد عدد اللاعبين في العملية الاستطرادية، فإنه من المهم أن تكون مصادر المعلومات هذه متاحة. وسوف تساعدنا هذه الدراسات والتقارير أيضاً على فهم الممارسات الاجتماعية في جميع أنحاء العالم وتقديم الاقتراحات المفيدة لإنفاذ الاستدامة العالمية. ومع ذلك، فمن المهم أيضاً أن نعترف بأن أصحاب المصلحة المختلفين يستخدمون تقارير مختلفة، ويقدمون رؤى أو حتى "حقائق" مختلفة. وقد يؤدي الاختيار بين مصادر المعلومات (والثقة في هذه المصادر) دوراً حاسماً في المناقشة ويحتاج إلى مزيدٍ من التحقيق.

(٥, ١٤) الاستنتاجات والمناقشة: جدول أعمال مشترك للإدخال السلس لتقنية حيوية صناعية مستدامة مقبولة

Conclusions and Discussion: A Joint Agenda for the Smooth Introduction of Acceptable Sustainable Industrial Biotechnology

لقد قدمنا سرداً لما يعتقده الخبراء من تأثير التقنية الحيوية الصناعية على مجتمعنا. ولقد أظهرنا أيضاً ما يعتقد المواطنون (الأوروبيون) أنه يمكن أن يدعموه، اعتماداً في المقام الأول على دراسات يوروبارومیتر الاستقصائية، وقد أشرنا إلى المخاوف الاجتماعية المحتملة التي قد تنشأ عن هذه التطورات. وقد استنتجنا بعض الدروس من جدال الأغذية المعدلة وراثياً والتي نعتقد أنها تعطي سبباً للحذر من وجهة النظر المفرطة في التفاؤل لقبول التقنية الحيوية الصناعية. وقد علمتنا هذه الدروس أن المزيد من المعرفة لا يؤدي بالضرورة إلى المزيد من الدعم لتقنية نامية. ووفرت لنا أيضاً المزيد من البصيرة في قضية المخاطر وأظهرت أن الخطر يمكن تجاوزه من قبل القيم

(١٢) لجنة التعديل الوراثي (COGEM) (٢٠٠٣م) نحو اطار متكامل لتقييم القضايا الاجتماعية والاخلاقية في التقنية الحيوية الحديثة.

(١٣) غير معروف. اللقاء التشاوري للاتحاد الأوروبي والولايات المتحدة: يوجد تقرير، ديسمبر ٢٠٠٠م.

الأخلاقية. وقد قلنا من خلال الدليل على أن المواطنين الأوروبيين لا يرفضون الأغذية المعدلة وراثياً أنه يمكن في بعض الأحيان تجاوز النهج العقلاني (في هذه الحالة لتوفير الاختيار الواعي) عن طريق الخوف العاطفي.

وأخيراً أظهرت دراسات التصور أن العلماء هم من أكثر المهنيين الذين يثق بهم الجمهور. وعلى هذا الأساس، وأيضاً على القول بأن مجتمعنا الديمقراطي لديه عقد مع العلماء والذي تتم مسائلتهم على أساسه، فقد قلنا بأن العلماء عليهم دور هام في تفاعل الجمهور مع انفاذ التقنيات الحديثة المستمدة من العلوم.

والحجة الرئيسة لتوخي الحذر في إدخال المجتمع الحيوي هي أن الجدل القائم لا يعتمد على العقلانية وأن مثل هذا السياق الانفعالي قد يؤدي بسهولة إلى ردود فعل مساوية غير عقلانية من السياسة والصناعات. ومع ذلك، فقد أشرنا أيضاً إلى الدروس المستفادة من تحسين إشراك جميع أصحاب المصلحة ومسؤوليتهم عن الأشكال الجديدة للتفاعل مع الجمهور. ويتطلب هذا الاستعداد للعمل، والاستعداد للاستماع إلى الحجج واتخاذ الإجراء بشأن المخاوف. وهو يتطلب كذلك مصالحة جميع الأطراف، والتي يمكن القيام بها إذا تبنت جميع الأطراف الاستدامة كقيمة أساسية. وهذا هو التحدي الذي يواجه الجمهور؛ لأن الاستدامة ليست شيئاً ذا تأثير مباشر على الفرد. وبالنسبة للكثيرين فإنها تتعلق مباشرةً بوجهة نظر معينة للعالم. وفي المقابل، غالباً ما يتم تبني الكثير من التطورات الجديدة في مجال الرعاية الصحية كتحسينات مباشرة لنوعية حياة الناس.

إنه لمن المشكوك فيه ما إذا تم قبول التطبيقات الجديدة للبيئة (وبذلك لأجيال المستقبل) بدرجةٍ إيجابية على قدم المساواة من الجميع.

(١, ٥, ١٤) العقبات والتحديات Hurdles and Challenges

يتم تحدي السياسيين من أجل التوصل إلى الحوافز المناسبة والتنظيم، لكنهم يعتمدون على الأدلة العلمية الجديرة بالثقة التي تدعم عملهم. وللأسف فإن هذه الأدلة العلمية فقط هي التي توضع على كفة الميزان بكثرة في النقاش في الوقت الحاضر. ويتراوح النقاش بشكلٍ متزايد من العقلانية إلى الانفعالية. ويؤدي اتخاذ الموقف إلى الاستقطاب والخمول السياسي. ومن أجل التوفيق بين وجهات النظر المختلفة فإنه من المهم إيجاد الأهداف المشتركة. وخلص الخبراء الذين جاءوا معاً لمناقشة القضايا المستقبلية في التقنية الحيوية الصناعية إلى أن "الاستدامة" يمكن أن تؤخذ كقيمة أساسية. وأوصوا بوضع جدول أعمال مشترك لجميع أصحاب المصلحة المعنيين، مع وضع فكرة الاستدامة هذه كقيمة أساسية. ومع ذلك، فإننا نستنتج أنه بالإضافة إلى هذه القيمة الأساسية، فإننا بحاجة للتأكد من أن النباتات تفي أيضاً بالاحتياجات الأساسية للغذاء، والصحة والسكن، والتوظيف.

وقد رأينا عند استكشاف القضايا أن الآراء الشخصية قد تؤدي إلى مواقف مختلفة، والتي لا يتم احضارها غالباً في المناقشة، وقد تؤدي إلى المطالبات العاطفية. ويتطلب هذا استعداداً للعمل معاً ومناقشة الطريقة للتوفيق بين المواقف والآراء.

ومن الجيد أن نرى أنه تتم مشاركة هذا الرأي من قبل عدة منظمات متعددة أصحاب المصلحة مثل البرنامج الأوروبي للكيمياء المستدامة جنباً إلى جنبٍ مع منظمة EuropaBio للتجارة الأوروبية، ومجلس إدارة العلوم في اللجنة الأوروبية، والفريق العامل المعني بالتقنية الحيوية للـ OECD وصندوق البنك الدولي. إن أمامهم وقت صعب.

(١٤ ,٥ ,٢) التوصيات لمزيدٍ من الدراسات Recommendations for Further Studies

كما قيل في النص السابق فإن فهم المخاوف العامة هو أمر بالغ الأهمية ويشمل فهم أوسع بكثير يتضمن القيم، والمصالح الاقتصادية التي تتعامل مع عدم اليقين، والثقة، والمسؤولية. وقد أظهرنا أنه على الرغم من أن قضايا السلامة يمكن أن تمثل مطلباً للاستقلالية الفردية، فإن قضية استخدام الأراضي قد تمثل أيديولوجية أعمق خلف الحكم العالمي. وهذه القيم تكون بلا شك متعلقة بوجهات نظر مختلفة حول العلاقة بين البشر والطبيعة، والتي يمكن أن تكون مثيرة للجدل. والسؤال هو ما إذا كانت هذه الآراء المثيرة للجدل حول الحكم والاستقلالية تعقد من قبل الناس نفسهم وعما إذا كانت مناقشة هذه القيم الأساسية يمكن أن تساعد في البحث عن حلول مقبولة للتنمية المستدامة. ونحن نحتاج مع هذا الفهم إلى تطوير أشكال جديدة من التفاعل مع المجتمع.

(١٤ ,٥ ,٣) ما الذي يعنيه هذا للمواطنين؟ What Does It Mean for Citizens?

إن المجتمع الحيوي سوف يغير المشهد، والقوى السياسية، ودخولنا الوطنية، جميع العوامل التي سيحتاجها المواطنون من أجل التصالح. ولكن وكما تم الزعم سابقاً، فإن جدول الأعمال المشترك لزيادة الاستدامة يعتمد أيضاً على انخفاض استخدام الطاقة والمواد. ويتطلب هذا مسؤولية وتغيير نمط الحياة من الجميع وإعادة تقييم كل ما نقوم به (الإجازات، والرياضة)، وما نستخدمه (السفر، والتغليف، ...إلخ)، وما نتناوله. ومن هذا المنطلق فإنه يتطلب أن تصبح الاستدامة قيمة أخلاقية.

شكر وتقدير Acknowledgments

تم تمويل هذا العمل بصورةٍ جزئية من مركز كلوفير لعلم جينومات التخمر الصناعي ومركز المجتمع وعلم الجينومات وهما جزء من المبادرة الهولندية للجينومات/ المنظمة الهولندية للبحث العلمي.

المراجع References

[١] Gaskell, G. and Bauer, M.W. (2001) *Biotechnology 1996-1999: The Years of Contro-versy*, Science Museum, London.

[٢] Caesar, W.K., Riese, J., and Seitz, T. (2007) Betting on biofuels. *The McKinsey Quarterly*, **2,** 53-63.

[٣] Gaskell, G., Allansdottir, A., Allum, N., Corchero, C., Fischler, C., Hampel, J., Jackson, J., Kronberger, N., Mejlgaard, N., Revuelta, G., Schreiner, C., Stares, S., Torgersen, H. and Wagner, W. (2006) Eurobarometer 64.3: Euro-peans and Biotechnology in 2005: Patterns and Trends, A report to the European Commission's Directorate-General for Research.

[٤] European Federation of Biotechnology Task Group on Public Perceptions of Biotechnology and the Kluyver Center for Genomics of Industrial Fermentation (2006) Briefing Paper, Regulating Modern Biotechnology in Europe.

[٥] Konig, A., Cockburn, A., Crevel, R.W.R., Debruyne, E., Grafstroem, R., Hammerling, U., Kimber, I., Knudsen, I., Kuiper, H.A., Peijnenburg, A., Penninks, A.H., Poulsen, M., Schauzu, M., and Wal, J.M. (2004) Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (Gm) crops. *Food Chem. Toxicol.*, **42** (7), 1047-1088.

[٦] Kuiper, H.A., Konig, A., Kleter, G.A., Hammes, W.P., and Knudsen, I. (2004) Food and chemical toxicology-concluding remarks. *Food Chem. Toxicol.*, **42** (7), 1195-1202.

[٧] van den Eede, G., Aarts, H.J., Buhk, H.J., Corthier, G., Flint, H.J., Hammes, W., Jacobsen, B., Midtvedt, T., van der Vossen, J., von Wright, A., Wackernagel, W., and Wilcks, A. (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food Chem. Toxicol.*, **42** (7), 1127-1156.

[٨] Ajzen, I. (1991) The theory of planned behavior. *Organ. Behav. Hum. Decis. Process*, **50,** 179-211.

[٩] Spence, A. and Townsend, E. (2006) Examining consumer behavior toward genetically modified (GM) food in Britain. *Risk Anal.*, **26** (3), 657-670.

[١٠] Chen, M.F. (2007) Consumer attitudes and purchase intentions in relation to organic foods in Taiwan: moderating effects of food-related personality traits. *Food Qual. Pref.*, **18,** 1008-1021.

[١١] Kalaitzandonakes, N., Marks, L.A., and Vickner, S.S. (2004) Media coverage of biotech foods and influence on consumer choice. *Am. J. Agric. Econ.*, **86** (5), 1238-1246.

[١٢] Paschoud, M. and Sakellaris, G. (2007) *Public Attidudes Towards the Industrial Uses of Plants : The Epobio-Survey*, CPL Press, Newbury, UK.

[١٣] Powell, D.A., Blaine, K., Morris, S., and Wilson, J. (2003) Agronomic and consumer considerations for Bt and conventional sweet-corn. *Br. Food J.*, **105** (10), 700-713.

[١٤] Cook, A.J., Kerr, G.N., and Moore, K. (2002) Attitudes and intentions towards purchasing GM Food. *J. Econ. Psychol.*, **23** (5), 557-572.

[١٥] Gutteling, J., Hanssen, L., Veer, N., and van der Seydel, E. (2006) Trust in governance and the acceptance of genetically modified food in the Netherlands. *Public Underst. Sci.*, **15,** 103-112.

[١٦] Noussair, C., Robin, S., and Ruffieux, B. (2004) Do consumers really refuse to buy genetically modified food? *Econ. J.*, **114,** 102-120.

[١٧] Durant, J. (1992) *Biotechnology in Public*, Science Museum, London.

[١٨] Durant, J., Bauer, M.W., and Gaskell, G. (1998) *Biotechnology in the Public Sphere: A European Source Book*, Science Museum Publications, London.

[١٩] Gaskell, G., Allum, N., Bauer, M., Durant, J., Allansdottir, A., Bonfadelli, H., Boy, D., de Cheveigné, S., Fjaestad, B., Gutteling, J.M., Hampel, J., Jelsøe, E., Correia Jesuino, J., Kohring, M., Kronberger, N., Midden, C., Hviid Nielsen, T., Przestalski, A., Rusanen, T., Sakellaris, G., Torgersen, H., Twardowski, T., and Wagner, W. (2000) Biotechnology and the European public. *Nat. Biotechnol.*, **18,** 935–938.

[٢٠] Osseweijer, P. (2006) *A Short History of Talking Biotech* (Thesis), Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam.

[٢١] Rip, A., *et al.* (1995) *Managing Technology in Society: The Approach of Constructive Technology Assessment*, Pinter Publishers Ltd, London.

[٢٢] Adams, J. (1995) *Risk*, University College London Press, London.

[٢٣] Rohrmann, B. (1999) *Risk Perception Research: Review and Documentation*, No. 48, Jülich Research Centre, Jülich.

[٢٤] Renn, O. (1999) A model for an analytic-deliverative process in risk management. *Environ. Sci. Technol.*, **33,** 3049-3055.

[٢٥] Nowotny, H., Scott, P., and Gibbons, M. (2001) *Rethinking Science: Knowledge and the Public in An Age of Uncertainty*, Polity Press, London.

[٢٦] Marris, C., Wynne, B., Simmons, P., and Weldon, S. (2001) *Public Perceptions of Agricultural Biotechnologies in Europe: Final Report of the PABE Research Project*, University of Lancaster, Lancaster, UK.

[٢٧] Wynne, B. (1992) Public understanding of science research: new horizons or hall of mirrors? *Public Underst Sci.*, **1,** 37-43.

[٢٨] Wynne, B. (2006) Public engagement as a means of restoring publiuc trust in science-hitting the notes, but missing the music? *Community Genet.*, **9,** 211-220.

[٢٩] Churchman, C.W. (1979) *The Systems Approach and Its Enemies*, Basic Books, New York.

[٣٠] Rith, C., and Dubberly, H. (2007) Why Horst W. J. Rittel matters. *Des. Issues*, **23** (1), 72-74.

[٣١] Rittel, H.W.J. and Webber, M.R. (2005) Dilemmas in a general theory of planning. *Policy Sci.*, **4** (2), 155-169.

[٣٢] House of Lords (2000) *Science and Society-Report and Evidence*, HMSO, London.

[٣٣] POST Parliamentary Office of Science and Technology (2001) Open Channels: Public Dialogue in Science and Technology. Report No. 153.

[٣٤] The Royal Society and The Royal Academy of Engineering (2004) Nanoscience and nano-technologies: opportunities and uncertainties, www.royalsoc.ac.uk/policy (accessed 01-02-2010).

[٣٥] The Royal Society (2006) *Factors Affecting Science Communication: A Survey of Scientists and Engineers*, The Royal Society, London.

[٣٦] Moses, V. (2002) Biotechnology: Educating the public, European Commission report.

[٣٧] Osseweijer, P. (2001) *Course Book EU Advanced Workshop on Bioethics and Pubic Perceptions of Biotechnology*, EFB Task Group on Public Perceptions of Biotechnology, Delft, The Netherlands.

[٣٨] Munnich, G. (2004) Whom to trust? Public concerns, late modern risks and expert trustworthiness. *J. Agric. Environ. Ethics*, **17,** 113-130.

[٣٩] Fischer, G. (2000) Symmetry of Ignorance, Social Creativity, and Meta-Design. *Knowledge-Based System*, **13** (7-8), 527-537.

[٤٠] Ammann, K. and Papazova Ammann, B. (2004) Factors influencing public policy development in agricultural biotechnology, in *Risk Assessment of Transgenic Crops*, vol. **9** (ed. S. Shantaram), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.

[٤١] Slingerland, M.A., Klijn, J.A.E., Jongman, R.H.G., and van der Schans, J.W. (2003) The Unifying Power of Sustainable Development. Towards Balanced Choices between People, Planet and Profi t in Agricultural Production Chains and Rural Land Use: The Role of Science, Wageningen University, WUR-report Sustainable Development Wageningen (Report), pp. 1-94.

[٤٢] Slingerland, M.A., Traore, K., Kayode, A.P.P., and Mitchikpe, C.E.S. (2006) Fighting Fe deficiency malnutrition in West Africa: an interdisciplinary programme on a food chain approach. *Njas-Wageningen J. Life Sci.*, **53** (3-4), 253-279.

[٤٣] Pilemalm, S., Lindell, P.O., Hallberg, N., and Eriksson, H. (2007) Integrating the rational unified process and participatory design for development of socio-technical systems: a user participative approach. *Des. Stud.*, **28** (3), 263-288.

[٤٤] Osseweijer, P. (2006) A new model for science communication that takes ethical considerations into account-the three-E model: entertainment, emotion and education. *Sci. Eng. Ethics*, **12** (4), 591-593.

[٤٥] Osseweijer, P. (2006) Imagine projects with a strong emotional appeal. *Nature*, **444** (7118), 422-422.

[٤٦] Klapwijk, R., Knot, M., Quist, J., and Vergragt, P. (2006) Using design orienting scenarios to analyze the interaction between technology, behavior and environment in the sushouse project, in *User Behavior and Technology Development*, vol. **3,** Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 241-252.

[٤٧] Schuurbiers, D., Osseweijer, P., and Kinderlerer, J. (2007) Future issues in industrial biotechnology. *Biotechnol. J.*, **2007** (2), 1112-1120.

[٤٨] Frewer, L.J., Scholderer, J., and Bredahl, L. (2003) Communicating about the Risks and Benefits of Gentically Mddiefied Foods: The Mediating Role of Trust. *Risk Anal.*, **23** (6), 1117-1133.

[٤٩] O'Neill, O. (2002) *Autonomy and Trust in Bioethics*, Cambridge University Press, Cambridge.

[٥٠] Driessen, P. (2003) *Eco-Imperialism: Green Power, Black Death*, Free Enterprise Press, Washington D.C.

[٥١] Wisniewsky, J.P., Frangne, N., Massonneau, A., and Dumas, C. (2002) Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientifi c controversy. *Biochimie*, **84** (11), 1095-1103.

[٥٢] (2008) Integrated farming: Why organic farmers should use transgenic crops. *New Biotechnology*, **25** (2) 101-107.

[٥٣] Moses, V., coordinator (2008) Do European Consumers Buy GM Foods? (Final report, part I, II, project no 518435, London, Kings College).

obeikandl.com

obeikandl.com

ثبت المصطلحات

أولاً: عربي – إنجليزي

أ

أجسام الاثمار	Fruiting bodies
الأجسام المضادة أحادية النسيلة	Monoclonal antibodies
أجسام مشتملة	Inclusion bodies
الاحتباس الحراري	Greenhouse
احتشاء عضلة القلب الحاد	Actue myocardial infarction
الإحتكاك	Friction
الأحماض الدهنية الطيارة	Volatile fatty acids
الأحماض النووية الريبوزية (الرنا) الدقيقة	Micro RNAs
اختبار تشبع الموضع النشط الاندماجي	Combinatorial active site saturation test (CASTing)
الإختلال الوظيفي	Dysfunction
الإخلال بتنظيم	Deregulating
إدماج البروتوبلاست (إندونيكليزات)	Protoplast fusion
إدماج أو تكامل	Integration
إدمصاص أو امتزاز	Adsorption
الإذابة	Solubilization

obeikandl.com

أرباح الأسهم	Dividends
ارتباط أنوية جزيئات الماء	Nucleation
الارتباط بالأحماض الدهنية	Palmitylation
الارتباط بمجموعة الجليكوزيل	Glycosylation
ارتداد اللمعان	Brightness reversion
ارتفاع سكر الدم	Hyperglycemia
ارتفاع ضغط الدم	Hypertension
الأرض المجنبة	Set-aside land
إزالة الأحبار العائمة	Floatation deinking
إزالة الغابات	Deforestation
إزالة اللجنين	Delignification
استبدالات الأحماض الأمينية	Amino acid substitutions
الاستحلاب	Emulsification
الاستخلاص	Extraction
الاستخلاص التفاعلي	Reactive extraction
الاستخلاص التنفيذي	Perstraction
الاستخلاص الميكانيكي	Mechanical pulping
الاستدامة	Sustainability
الإستربتوميسيتات	Streptomycetes
الأسترة الاختيارية للنظائر الضوئية	Enantioselective esterification
الأسترة الداخلية للدهون	Lipid interestrification
الأسترة الناقلة	Transesterification
الاستنساخ	Cloning
أسيتيل-العامل المساعد أ	Acetyl-CoA
أسيلة	Acylation
الأسيلة الكيميائية (إدخال مجموعة الأسيل)	Chemical acylation

obeikandl.com

الأسينة (إدخال مجموعة السيانيد)	Cyanation
أشباه الموصلات	Semi-conductor
الأصباغ الاصطناعية	Synthetic dyes
إضافات	Supplements
إضافة الماء	Hydration
إضافة مجموعة الكربوكسيل	Carboxylation
إضافة مجموعة الهيدروكسيل	Hydroxylation
الأطباق دقيقة المستوى	Microtiter plates
إعادة الاستخدام	Re-use
إعادة التحام	Religation
إعادة التدوير	Recycling
إعادة الطبيعة	Renaturation
الأغشية الحيوية	Biofilms
الأغشية بين الأوعية الخشبية	Pit membranes
الإفراز	Excretion
الأكتينوميسيتات	Actinomycetes
الأكسدة الفوقية	Peroxidation
أكسيد الحديد الأسود (الماجنتيت)	Magnetite
الآلات المؤتمتة	Automated machines
الالتحام	Ligation
الالتصاق الحيوي	Bioadhesion
التهاب الجلد الإكزيمي	Atopic dermatitis
إلغاء أو نزع التناظر	Desymmetrization
الألياف القطرية	Radial thread
آلية أو كيفية	Mechanism
إمرار الهواء	Sparged

obeikandl.com

أمراض الأوعية الدموية الطرفية	Peripheral vascular diseases
أمراض القلب التاجية	Coronary heart diseases
الأمراض القلبية الوعائية	Cardiovascular diseases
أمينة اختزالية (إدخال مجموعة أمين مع الاختزال)	Reductive amination
أنابيب الكربون النانوية	Carbon nanotubes
الإنبعاث	Emission
الإنتاجية	Yield
إنتاجية حجمية	Volumetric productivity
الانتشار	Dispersion
انتشارية	Diffusivity
انتقائية المتشابهات	Enantioselectivity
الانتقائية المجسمة	Stereoselectivity
انتقائية تعتمد على اتجاه التفاعل	Regioselectivity
الإنجذاب	Affinity
الانحباس	Entrapment
انحلال الكتلة الحيوية حرارياً	Pyrolyze
انخفاض حرارة الجسم	Hypothermia
انذياب	Solvation
الإنزيم	Enzyme
إنزيم البلمرة	Polymerase enzyme
الإنزيم اللاحم للحمض النووي	DNA ligase
إنزيم مصاوغة الجلوكوز	Glucose isomerase
إنزيمات التقييد	Restriction enzymes
الإنزيمات الداخلية المحللة للنيوكلوتيدات	Endonucleases
الإنزيمات المحللة	Hydrolytic enzymes
الإنزيمات المرتبطة بالغشاء	Membrane-bound enzymes

obeikandl.com

الإنزيمات مفككة التفرعات	Debranching enzymes
انقباضات الرحم	Uterocontraction
إنقسام الببتيد صحيح الإشارة	Correct signal peptide cleavage
الأنيبيبات الدقيقة	Microtubules
الأنيونات	Anions
أوبيرونات	Operons
الأورام اللحمية	Stromal tumor
الأورام اللمفاوية غير-الهودجكينية	Non-Hodgkin's lymphoma
الأوكسوتروف (سلالة غير قادرة على إنتاج مركب عضوي معين)	Auxotroph strain
أوليئات	Oleate
الإيثيلين	Ethylene
إيديوتروف	Idiotroph
الإيديوليتات	Idiolites
الأيض الوسيط	Intermediary metabolism
أيونوفورات	Ionophores
أيونية المحلول	Ionic strength

ب

البادئ	Promotor
باستخدام البرامج الحاسوبية	In silico
ببتيد عصبي	Neuropeptide
الببتيدات الحلقية	Cyclic peptides
البدائل	Surrogates
بدائل أو متغيرات البروتين	Protein variants
البروتوبلاست	Protoplast

obeikandl.com

بروتين ألبومين المصل البشري	Human serum albumin
البروتينات الكثيرة الثديية	Mammalian polypeptides
البروتينات غير المتشابهة	Heterologous proteins
البسترة	Pasturization
بعد الوجبات	Post-prandial
بقايا الخلايا	Cell debris
البكتيريا السالبة لصبغة جرام	Gram-negative bacteria
البكتيريا العنقودية	Streptococci
البكتيريا الموجبة لصبغة جرام	Gram-positive bacteria
البكتيريا العصوية	Bacillus bacteria
البكتيريا المحبة للملوحة	Halophilic bacteria
بكتيريا إيشيريشيا القولون	*Escherichia coli*
بلازمينوجين الأنسجة	Tissue plasminogen
البلاستيكات الحيوية	Bioplastics
البلمرة التعاونية	Co-Polymerization
بلورات الإنزيم المرتبطة	Crosslinked enzyme crystals
البلورة ثنائية المتشابهات	Diastereomer crystallization
البيئات الغذائية	Media
البيئات المائية المتجانسة	Homogeneous aqueous media
البيئة الخالية من البروتين	Protein-free medium
البيئة الغذائية	Medium
بيئة خالية من الخلايا	Cell-free environment
بيئة دقيقة	Microenvironment

ت

التأثير المضاد	Antagonistic effect

obeikandl.com

التأثيرات التشكيلية	Conformational effects
تأثيرات تقسيمية	Partition effects
تآكل الجسيمات	Particle erosion
التبادل الأيوني	Ion Exchange
التبادل الحراري	Heat exchange
التبخير المسبق	Prevaporation
التبلور التجزيئي	Fractional crystallization
التبييض	Bleaching
تتابع	Cascade
تتحمل درجات الحرارة	Thermotolerant
التثبيط البيني	Interfacial inactivation
التثبيط التنافسي	Competitive inhibition
التثبيط الرجعي	Feedback inhibition
التثبيط الرجعي المنسق	Concerted feedback inhibition
التجارب السريرية	Clinical test
التجانس تحت ضغط عالي	High-pressure homogenization
التجرثم (تكوين الجراثيم)	Sporulation
التجريد الغازي	Gas stripping
التجزئة	Fractionation
التجفيف تحت ضغط	Desiccation
تجهيز أو معاملة البروتين	Proteolytic processing
تجويفات الخلية	Cell vacuoles
تحت درجة حرارة الصفر	Subzero
تحت مستوى الميكرون	Submicron
التحجيم	Sizing
التحديد الكمي	Quantification

obeikandl.com

التحفيز البيولوجي أو التحفيز الحيوي	Biocatalysis
التحكم المباشر	On-line control
التحكم بدرجة التعكير	Haze control
التحلل الإنزيمي	Enzymatic hydrolysis
التحلل الحيوي	Biodegradation
تحلل السلالة	Strain degeneration
التحليل الإحصائي متعدد المتغيرات	Multivariate statistical analysis
تحليل الجلوكوز	Glycolysis
التحليل الجماعي	Association analysis
التحليل الحراري	Pyroconversion
التحمض	Acidification
تحمل التجميد	Freeze tolerance
التحميص	Torrefaction
التحول البلازميدي	Plasmid transformation
التحويل للغاز	Gasification
التحويل للغاز حرارياً	Pyro-gasification
التحويلات الحيوية	Bioconversion
التحويلات الحيوية	Biotransformation
تخثر البروتين	Protein coagulation
تخثر الدم	Blood clotting
تخصصية الإنزيم	Enyzmatic specificity
تخصصية وسط التفاعل	Substrate specificity
تخليق البروتين	Protein synthesis
التخليق التجميعي	Combi-synthesis
التخليق التطفيري الحيوي	Mutational biosynthesis
التخليق الحيوي الاندماجي	Combinatorial biosynthesis

obeikandl.com

Chemical synthesis	التخليق الكيميائي
Biosynthesis	التخليق أو التكوين الحيوي
Fermentation	التخمير
Bottom fermentation	التخمير السفلي
Top fermentation	التخمير العلوي
Metabolic flux	تدفق الأيض
Convective flow	تدفق الحمل الحراري
Outflow	التدفق الخارج
Flow cytometry	التدفق الخلوي
Laminar flow	التدفق الصفحي
Efflux	التدفق من داخل الخلية إلى خارج الخلية
Thermal denaturation	التدمير الحراري
Aluminum overload	تراكم الألمنيوم
Supramolecular structures	التراكيب الجزيئية الفائقة
Fibrillar structures	التراكيب الليفية
Terpenes	التربينات
Gene order	ترتيب الجينات
Microfiltration	الترشيح الدقيق
Ultrafiltration	الترشيح الفائق
Gel filtration	ترشيح الهلام
Vacuum drum filtration	الترشيح بأسطوانات الفراغ
Membrane microfiltration	الترشيح فائق الغشائية
Tertiary structure	التركيب الرباعي
Chirality	التركيب الفراغي
Double-stranded structure	التركيب ثنائي الخيط
Spatial structures	تركيبات فراغية

obeikandl.com

تركيز الإنتاج	Production titer
الترميز أو التشفير	Encoding
التسام	Sublimation
تسرطن القولون	Colonic carcinogenesis
التسكر	Saccharification
تسكر النشا	Starch saccharification
التسلسل التوقيعي المتماثل الضخم	Massive parallel signature sequencing
تسلسل الجينات البادئ	Promoter sequence
تسلسل الجينات	Gene sequence
التشبع	Saturation
التشبع الفائق	Supersaturation
التشتت المحوري	Axial dispersion
تشريب	Impregnation
التصبغ أو التلون	Pigmentation
تصعيد أو زيادة مستوى العملية	Process scale-up
تصلب الشرايين	Atherosclerosis
التضاعف	Duplication
التضاعف	Multiplication
التطاير	Volatility
تطرية اللحوم	Tenderizing of meat
التطعيم	Grafting
التطفير (احداث الطفرة)	Mutagenesis
التطفير التحويلي	Transposition mutagenesis
التطفير التشبعي التكراري	Iterative saturation mutagenesis
التطفير التشبعي لموقع الجين	Gene site-saturation mutagenesis
التطفيرات الموجهه-المكان	Site-directed mutagenesis

obeikandl.com

تعاوني أو تآزري	Synergistic
التعبير الجيني	Gene expression
التعبير المفرط	Overexpression
التعبير النسخي	Transcript expression
التعبير عن الجينات في نواتجها	Expression
تعدد أشكال	Polymorphism
تعدد التوليد أو الإنتاج	Polygeneration
التعديل	Recombinantion
تعديل البروتين أثناء عملية الترجمة	Myristoylation
التعديل الجيني أو الوراثي	Genetic recombinantion
التعديلات بعد عملية الترجمة	Posttranslational modifications
تعزيز النقيض باستخدام الرنين المغناطيسي	MRI contrast enhancement
التعقيم-في-المكان	Sterilization-in-place
التغذية المتقطعة	Intermittent feeding
التغذية المستمرة	Continuous feeding
التغذية المعوية	Enteral nutrition
تغذية على دفعات	Batch feeding
التغذية عن طريق الحقن	Parenteral nutrition
التغليف	Encapsulation
تغير طبيعة الإنزيم	Enzyme denaturation
تفاعل البلمرة المتسلسل أو تسلسل البلمرة	Polymerase chain reaction (PCR)
التفاعل المزدوج	Coupled reaction
تفاعل تسلسل البلمرة عرضي الخطأ	Error-prone polymerase chain reaction
تفاعل تمدد الحلقة	Ring expansion reaction
تفاعل طارد للحرارة	Exothermic
تفاعل محدد للمعدل	Rate limiting reaction

obeikandl.com

التفاعلات البنائية	Anabolic reactions
التفاعلات التي تتم بواسطة الإنزيمات	Enzyme-mediated reactions
تفاعلات الخلفية	Background reactions
التفاعلات الشعرية	Capillary interactions
التفاعلات الهدمية	Catabolic reactions
التفاعلات الهدمية البنائية (ثنائية الطبيعة)	Amphibolic reactions
التفاعلات ثنائية القطب	Dipole interactions
تفاعلي	Reactive
تفل قصب السكر (المصاصة)	Bagasse
التقشر الداخلي	Incrusts
التقطير التجزيئي	Fractional distillation
التقطير عابر الأغشية	Transmembrane distillation
التقنية الحيوية الصناعية	Industrial Biotechnology
التقييد غير التساهمي	Non-covalent immobilization
التكاثر	Reproduction
التكاثر الجزيئي	Molecular breeding
تكرار الجين	Gene replication
تكرار النتائج	Reproducibility
تكرارات ترادفية	Tandem repeats
تكشف أو الغاء طي البروتين	Protein unfolding
تم إضعافها	Attenuated
تماسي	Tangential
تمايز الخلايا	Cell differentiation
التمثيل الغذائي (الأيض)	Metabolism
التمثيل أو البناء الضوئي	Photosynthesis
التمعدن	Mineralization

obeikandl.com

التنافر الحيوي	Biorepulsion
التناول عن طريق الفم	Oral adminstration
التنظيف-في-المكان	Clean-in-place
التنظيم الرجعي	Feedback regulation
تنفيذ الخلية (تعديل الجدار الخلوي)	Cell permeabilization
تنمو في درجة حرارة عالية	Thermophilic
تنمو في وجود ثاني أكسيد الكربون	Capnophilic
التنوع البيولوجي أو الحيوي	Biodiversity
التهاب السحايا	Meningitis
تهجين الجينات	Gene annealing
توازن الكتلة الحيوية	Biomass balance
التوازن بين صورتي الكيتو (الألدهيد أو الكيتون) والإينول	Tatuomerism
التوافق الحيوي	Biocompatability
توتر السطح البيني	Interfacial tension
التوضيح	Elucidation
توضيح التركيب الكيميائي	Chemical structure elucidation
التوفر الحيوي	Bioavailability
توفير أو تجديد العوامل المساعدة	Cofactor generation
تيار الحصاد	Harvest stream
التيارات	Turbulence

ث

ثابت التفاعل	Km
ثابت تثبيط الإنزيم	Ki
الثبات في الأحماض	Acid stability

obeikandl.com

الثري الدياتومي	Diatomaceous earth
ثنائية الطبيعة تجاه الماء	Amphipathic

ج

الجذر التربيعي لمتوسط الخشونة	Root mean square roughness
الجراثيم الداخلية	Enteropathogens
جرثومة	Germ
الجزيء الأم أو الأصلي	Parent molecule
الجزيئات الصغيرة	Micromolecules
جزيئات كبيرة	Macromolecules
الجسم المضاد	Antibody
جلطة الأوردة العميقة	Deep vein thrombosis
الجلوتامات	Glutamate
جليكوزيلاتية	Glycosylated
جم/ ل (جرام/ لتر)	g/l
جنس	Genus
جهاز التغويز (التحويل إلى الغاز)	Gasifier
جهاز الطرد المركزي الساكب أو الحلزوني	Decanter or scroll centrifuge
جهاز الطرد المركزي ذو الأقراص المتراصة	Disc stack centrifuge
جهد الغشاء	Membrane strain
جودة الملمس	Texture quality
الجين الورمي أو السرطاني	Oncogene
الجينات التركيبية	Structural genes
الجينات المقاومة	Resistance genes
جينات تنظيمية	Regulatory genes

obeikandl.com

جينات خارجية	Foreign genes

ح

حالة التقنية	State of technology
حامض الجلوكونيك	Gluconic acid
حامضة	Sour
حامل للحديد	Siderophore
الحجب	Chelation
الحجر الإسفنجي	Pumice stone
حجم العمل	Working volume
الحذف الاستهدافي	Targeted deletion
الحرارة الأيضية التراكمية	Cumulative metabolic heat
حرارة التبخر الكامنة	Latent vaporization heat
حركية	Kinetics
الحساسات الحيوية	Biosensors
الحساسات القابلة للسحب	Retractable sensore
الحساسة للإجهاد	Shear-sensitive
الحشرات ذوات الجناحين	Diptera
حقن السوائل	Infusion
الحقن أو التلقيح	Inoculation
حقيقي	Intrinsic
الحمأة المنشطة	Activated sludge
حمض الأسبارتيك	Aspartic acid
الحمض الأميني الأساسي	Essential amino acid
الحمض الدهني	Fatty acid

obeikandl.com

حمض الليسين-هيدروكلوريك	Lysine-HCl
الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي (الدنا)	DNA
الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل	rDNA
الحمض النووي الريبوزي (الرنا)	RNA
الحمض النووي الريبوزي الناقل	tRNA
الحمى الإنتكاسية	Relapsing fever
الحيز الرأسي	Headspace
الحيوانات المجترة	Ruminants
الحيوانات المعدلة وراثياً	Transgenic animals
حيود الأشعة السينية	X-Ray diffraction

خ

خارج الخلية	Extracellular
الخريطة الوراثية الكاملة (الجينوم)	Genome
خصائص الديناميكية الحركية	Entropy
الخصائص الفيزيائية الكيميائية	Physico-chemical properties
خصائص حسية	Organoleptic characteristics
خط خلوي	Cell line
خطوات الترويق	Clarification steps
خطوط الخلايا	Cell lines
خفض أو إزالة الضغط	Depressurization
الخلايا التفتلية	Mitotic cells
الخلايا الثديية (خلايا الحيوانات الثديية)	Mammalian cells
الخلايا الجذعية	Stem cells
الخلايا المجفدة	Lyophilized cells

obeikandl.com

خلايا سرطانية خالدة	Immortal cancerous
خلط الجينات	Gene shuffling
الخميرة لغرض معين	Sake-yeast

د

داء الطفيليات الأسطوانية	Strongyloidiasis
داء المثقبيات	Trypanosomiasis
داخل الخلية	Intracellular
دالتون	Da
الدبس الناتج من صناعة السكر	Molasses
درجة الأوكتان	Octane rating
درجة الرقم الهيدروجيني لبيئة الزراعة	Medium pH
درجة الصبغ الرجعية	Backstaining
الدعامات المتجانسة	Monolithic supports
الدعامات المسامية	Porous supports
الدهون الفوسفاتية	Phospholipids
دوارق الهز (الدوارق المهتزة)	Shake flasks
دون انقطاع	Unabataed
الديناميكا الحرارية للتفاعل	Reaction thermodynamics

ر

الرابط الفراغي	Chiral ligand
الرابطة الببتيدية	Peptide bond
راتنجات الفينول	Phenolic resins
الرجيع	Rejects

obeikandl.com

رشيح	Filtrate
رقم الحبيبات	Grit number
الروابط الإستيرية	Ester bonds
روابط بين الجزئيات	Intramolcular bonds
الروابط داخل الجزيئات	Intermolcular bonds
روح العصر	Zeitgeist (spirit of the time)
الريبوسومات	Ribosomes

ز

الزائف	Pseudo
زراعات الحالة الصلبة	Solid-state cultures
زراعة الأنسجة	Tissue transplant
زراعة الخلايا المعلقة	Suspension culture
زراعة الدفعة الواحدة ذات النضح	Perfusion batch culture
زرع الأعضاء	Organ transplantation
الزغب المجهري	Microscopic fuzz
زوجية العدد الكروموسومي في النواة	Diploid
زيادة الإنتاجية المفرطة	Overproudction
زيادة الضغط	Pressurization
زيادة المستوى	Scalability
زيادة المواد المغذية	Eutrophication
زيوت التشحيم	Lubricating oils
الزيوت النباتية	Vegetable oils

س

سبر تسلسل الجين	Knocking out

obeikandl.com

سرعة التفاعل القصوى	Vmax
سرعة طرف المقلب	Agitation tip speed
السطح البيني	Interface
سقالات التدعيم (دعامات النمو)	Scaffolds
السكتة الدماغية	Stroke
السكر الثنائي	Disaccharide
سكر الجلوكوز	Glucose
السكر الرباعي	Tetrasccharide
سكر اللاكتوز	Lactose
سكر خماسي	Pentose
السكريات	Sugars
السكريات السداسية	Hexoses
السكريات العديدة	Polysaccharides
سلاسل جانبية	Side-chains
سلالات التقطير	Distiller's strains
السلالة البرية أو الأصلية	Wild-type strain
السلسلة الغذائية	Food chain
السمية المرتبطة بالجرعة	Dose-associated toxicity
السويداء أو الجرثومة الداخلية	Endosperm
سياسة البحث والتطوير	R & D Policy (Research & Development)
سياليلاتية	Sialylated
سيلان الدم	Hemophilia
السيليولوز	Cellulose

ش

الشاردة	Moiety

obeikandl.com

شبه المخلقة	Semi-synthetic
الشحوم الثلاثية	Triglycerides
شحيح الذوبان	Sparingly soluble
شراب منقوع الذرة	Corn steep liquor
الشرش	Whey
شرش اللبن	Milk whey
شريط التعبير	Expression cassette
شفرات التقليب	Impeller blades
الشفرة	Codon
الشفرة الوراثية	Genetic code
الشوارد أو الشقوق	Radicals
شوائب	Impurities

ص

الصحة العامة	Sanitation
الصحة والنظافة	Hygiene
صدادات	Baffles
الصدمة الإنتانية	Spetic shock
الصدمة التناضحية	Osmotic shock
الصعيد النهائي	Final plateau
صفائف الثرمستور	Thermistor arrays
صناعة الطحن الرطب للذرة	Corn wet milling indutsry
الصوتنة (التأثير بالموجات الصوتية)	Sonication
صورة محملة أو مقيدة	Immobilized form

obeikandl.com

ض

ضاخ الهواء	Air sparger
ضخ الهواء	Sparging
الضربات المحورية	Axonemal beating
ضغط العمل المطلق	Absolute working pressure
الضيق الرجعي	Restenosis

ط

طاردات الطفيليات	Antihelmintics
الطاقة التمثيلية	Metabolizable energy
الطبقة التركيبية	Structural layer
الطبقة المقاومة للصهر	Refractory layer
طبقة رقيقة	Film
طبيعة التفاعل الكاره للماء	Hydrophobicity
الطحالب الدقيقة	Micro-algae
الطرد المركزي	Centrifugation
طريقة الزراعة السطحية	Surface culture
طريقة الزراعة المغمورة	Submerged culture
طريقة المحاولة والخطأ	Trial-and-error
طريقة إنتقاء كيميائية/ اتجاهية/ فراغية	Chemo-regio-stereo-selective manner
الطفرة الوراثية	Mutation
الطفيليات المفصلية	Arthropod parasites
الطور التأخري	Lag phase
الطور الغبيري (طور تكوين الكونيديا)	Conidial state

obeikandl.com

طي البروتين	Protein folding

ظ

الظروف المحيطة	Boundary conditions

ع

عالية الكثافة من الخلايا	High-cell density
عالية الميكنة	Highly mechnaized
عامل الاستخلاص أو الاسترداد	Recovery agent
العامل الحاجب	Chelator
عامل الموت الموضعي للورم	Tumor necrosis factor
عامل أو ناقل الاستنساخ	Cloning vector
العائق الفراغي	Steric hindrance
العائل أو الكائن المضيف	Host
العتيق البارد للبيرة	Chill-proofing of beer
عدة تشخيصية للتعديل الوراثي	Recombinant diagnostic kit
عدد الدوران	Turnover number
عدم الإدمصاص أو الإمتزاز	Desorption
عديد الروابط الثنائية	Polyene
عديد الوحدات	Polymer
عديمة الأجنحة	Siphonoptera
عزم الدوران	Rotation torque
عزم الدوران	Torque
العلاج المناعي	Immunotherapy
علم الأحياء الدقيقة (ميكروبيولوجي) في التخمير	Fermentation microbiology

obeikandl.com

عمل الطرد المركزي	Centrifugal action
عمليات الزراعة المختلطة أو المشتركة	Mixed culture processes
العمليات الغشائية	Membrane processes
عملية الاستخلاص	Pulping process
عملية التجانس	Homogenization
عملية الترشيح	Filtration process
عملية التوسيع التعاقبي	Staggered Extension process
العملية الحيوية	Bioprocess
عملية الطحن	Mill operation
عملية الموازاة	Parallelization
عملية تخمير أحادية الكائن الحي	Monoseptic fermentation
عن طريق الحقن	Parentally administered
عوامل التلبد	Flocculating agents
العوامل المساعدة	Cofactors
العوامل المضادة للطفيليات	Antiparasitic agents
العوامل المضادة للفطريات الزراعية	Agricultural antifungal agents
عوامل تخثر الدم	Clotting agents

غ

الغدد النخامية	Pituitary glands
الغرويات	Colloids
الغشاء	Membrane
غشاء البلازما الراشح	Leaky plasma membrane
غشاء سيتوبلازمي	Cytoplasmic membrane
غشاء شبه نفاذ	Semi-permeable membrane

obeikandi.com

غشاء كاره للماء	Hydrophobic membrane
غشائية الأجنحة	Hymenoptera
غير أصلية	Non-native
غير القابلة للامتزاج	Immiscible
غير المتماثلة	Asymmetric
غير عادية	Atypical
غير قابل للإشتعال	Non-flamable
غير قابل للذوبان	Insoluble
غير قطبية	Non-polar
غير متبلورة	Amorphous
غير مسرطن	Non-carcinogenic
غير مشبعة	Unsaturated
غير مطفر	Non-mutagenic

ف

فترة عمر الرف (التخزين)	Shelf-life
فترة عمر-النصف	Half-life time
فرز الخلايا المغناطيسي	Magnetic cell sorting
الفرز والاختيار	Screening
الفسفرة (إدخال مجموعة الفوسفات)	Phosphorylation
فصل البلورات لأشعة إكس	X-Ray crystallography
الفصل الغشائي الكهربائي	Electrodialysis
الفصل اللوني	Chromatography
الفصل اللوني الإزاحي	Displacement chromatography
الفصل اللوني الانجذابي	Affinity chromatography

obeikandl.com

الفصل اللوني التبادلي للأيونات	Ion Exchange chromatograpgy
الفصل اللوني ذو التفاعلات الكارهة للماء	Hydrophobic interaction chromatography
الفصل اللوني عكسي الطور	Reversed phase chromatography
الفطريات الداخلية	Endophytes
الفعالية	Effectiveness
فقاعات الغاز الدقيقة	Aphrons
فقر الدم	Anemia
فوسفات نيكوتين أميد أدينين داي نيكليوتيد المختزل	NADPH
فوسفات نيكوتين أميد أدينين داي نيكليوتيد المؤكسد	NADP
في التجارب المعملية أو في المختبر (خارج الخلايا)	In vitro
الفيروس البكتيري (فاج)	Phage
فيروس المخلوي التنفسي	Respiratory syncytial virus
الفيروسات العصوية	Baculoviruses
فينيل ألانين	Phenylalanine

ق

قابل للتحلل الطبيعي أو الحيوي	Biodegradable
القابلة للأكل	Edible
القابلة للامتزاج بالماء	Water miscible
قابلة للتخمير	Fermentable
قابلية الطرق	Beatability
قرص التمزق	Rupture disk
القسطرة	Angioplasty
قشرية الأجنحة	Lepidoptera
القفيصة	Capsid

obeikandl.com

قلابات المخمر	Impellers
القلويدات	Alkaloids
القناة المعدية المعوية (القناة الهضمية)	Gastrointestinal tract
قوالب وقتية	Transient tempelate
قوة الشد	Tensile strength
القياسات الخلوية الواسعة	Cell-wide measurements
القياسات عند نقطة النهاية	End-point measurements
قيمة توليد الحرارة	Calorific value

ك

الكاتيونات	Cations
الكاتيونات الكثيرة	Polycations
الكائن المطفر أو المعدل	Mutant
الكائنات الأرقي أو الراقية	Higher organisms
الكائنات الحية الدقيقة	Microorganisms
الكائنات المفضلة لكميات دقيقة (ضئيلة جداً) من الهواء	Microaerophilic
الكائنات الممرضة	Pathogens
الكائنات بدائية النواة	Procaryotes/Prokaryotes
كائنات تستطيع استخدام مركبات الميثيل (ميثيلوتروفيك)	Methylotrophic
كائنات تنمو في الظروف القاسية	Extremophiles
الكائنات حقيقية النواة	Eucaryotes/Eukaryotes
الكبح الهدمي	Catabolite repression
كبيرة الحلقات	Macrolide
الكتلة الحيوية	Biomass
كتلة الخلايا	Cell mass

obeikandi.com

الكحول	Alcohol
الكحول الإيثيلي الحيوي	Bioethanol
الكربوهيدرات (السكريات)	Carbohydrates
كروموأوليجوببتيد	Chromooligopeptide
الكروموسوم أو الصبغي	Chromosome
الكفاءة البيئية	Eco-Efficiency
كفاءة التحويل	Conversion efficiency
الكفير	Kefyr
الكهربية الشعرية الموازية	Capillary electrophoresis
كهروضغطية	Pizoelectric
الكوجي	Koji
الكوميس	Koumiss
كيفية التأثير	Mode of action
الكيماويات الدقيقة (التي تنتج بكميات ضئيلة)	Fine chemicals
الكيماويات الزيتية الوسيطة	Oleo-chemicals
الكيماويات الضخمة (تنتج في أحجام كبيرة)	Bulk chemicals
كيمياء الكربون	Carbochemistry
الكيميائيين الفيزيائيين	Physico-chemists

ل

اللافقاريات	Invertebrates
اللاقح أو البادئ أو الحاقن	Inoculum
لاهوائية	Anaerobic
اللب الحراري الميكانيكي	Thermomechanical pulp
اللجنين	Lignin

obeikandi.com

اللدائن الحرارية	Thermoplastics
اللزوجة الحركية	Kinematic viscosity
لفة لكل الدقيقة	RPM
اللقاحات	Vaccines
اللولب المزدوج	Double helix
ليفات	Fibril

م

الماء الشعري	Capillary water
المادة البادئة	Starting material
المادة المتجمعة أو المتلبدة	Flocculent
المادة المدمصة	Adsorbent
مادة تشحيم	Lubricant
مادة تعطي الطعم اللاذع	Acidulant
مبادلات الحرارة	Heat Exchanger
مباشرة في الموقع	In situ
مبيدات الأعشاب الحيوية	Bioherbicides
مبيدات الحشرات الحيوية	Bioinsecticides
متجمعة	Aggregarted
متخصص في المجهر	Microscopist
متخصص للسلالة	Strain specific
متدفقات التبييض	Bleaching effluents
المترافقة	Conjugated
متراكب إنزيمي	Enzyme complex
المتراكبات	Complexes

obeikandl.com

متساوية الأجنحة	Isoptera
متغايرات	Variants
متغيرات الإنزيم	Enyzme variants
متلازمة	Syndrome
المتماثلة	Symmetric
متوسط الخشونة الحسابي	Arithmetic mean roughness
مثبطات المناعة	Immunosuppressants
مثخن	Thickener
مثيلة (إضافة مجموعة الميثيل)	Methylation
مجال نهاية الكربون	C-terminal domain
مجاميع الإنزيم المرتبطة	Crosslinked enzyme aggregates
المجففة بالرذاذ	Spray-dried
مجموعات الأحماض الأمينية	Amino acid residues
المجموعات الوظيفية	Functional groups
مجهر	Microscope
المحاصيل المعدلة وراثياً	Genetically modified crops
محاكاة السرير المتحرك	Simulated moving bed
المحاليل	Solution
المحبة القلوية العالية	Alkalophilic
محتوي الطاقة	Enthalpy
المحتوي الميكروبي للأمعاء	Gut Microbiota
محركات الإشعال بالشرارة	Spark-ignition engines
محفز	Promotant
المحفز الحيوي	Biocatalyst
المحفز الكيميائي	Chemical catalyst
محفزات نمو النبات	Plant growth stimulators

obeikandl.com

محفزة لنمو البكتيريا في الجهاز الهضمي	Prebiotic
المحللات	Hydrolysate
محللات الجلطات	Thrombolytics
محلول الرشيح	Permeate
المحلول الطافي	Supernatant
المحلول المنحل بالكهرباء	Electrolyte
محلول أو بيئة التخمر	Broth
محلول كهربائي متضاعف	Poly electrolyte
المحيط بعد البلازميدي	Periplasmic space
مخصب	Enriched
المخمر	Fermenter
المخمر ذو الأدراج	Tray Fermenter
المذيبات	Solvents
المذيبات المكلورة	Cholrinated solvents
المذيبات ذات درجات الحرارة فوق الحرجة	Supercritical solvents
المذيلات العكسية	Reverse micelles
مرادفات أو مواد أولية (مركبات تتفاعل لتنتج مركبات أخرى)	Precursor
المرتبطة لاتساهمياً	Non-covalently bound
المرحلة الانتقالية	Transition state
مرحلة النمو الأسي أو الإطرادي أو التصاعدي	Exponential growth phase
مرحلة النمو الثابتة	Stationary growth phase
مرحلة إنتاج نواتج الأيض الثانوي	Idiophase
المرسبات	Preciptatnts
مرشح تفريغ الأسطوانة الدوارة	Rotary drum vacuum filter
مرض الدعامة–مقابل–العائل	Graft-versus-host disease
مرض الشريان التاجي	Coronary artery disease

obeikandl.com

مرض العمى النهري الإنساني	Onchocerciasis
مرض الورم الحبيبي المزمن	Chronic granulomatous disease
مرض تراكم الحديد	Iron-overload disease
المرضية	Pathogenesis
مركب أوكسجيني	Oxygenate
مركب غير نشط ضوئياً	Meso-compound
مركب متأكسد	Oxidized compound
مركب وسيط	Intermediate
المركبات المختزلة	Reduced compound
المركبات ثنائية الوقود	Flex-fuel Vehicle
مركبات هيدروكربونية	Hydrocarbons
المزرعة البادئة	Starter culture
مزرعة أو سلالة ميكروبية	Microbial culture
مزرعة على دفعة واحدة	Batch culture
مزيج	Blend
المساحات الخلالية	Interstitial spaces
مساحة سطح المفاعل	Reactor headspace
المسار التخليقي الحيوي	Biosynthetic pathway
المسار الوسطي	Anaplerotic flux
المساعدات	Adjuncts
مسبار أو حساس	Probe
مسبق	Ex ante
مستحضراً موضعياً	Topical preparation
المستحلبات	Emulsifier
المستحلبات الحيوية	Biosurfactants
المستحلبات الدقيقة	Microemulsions

obeikandl.com

مستخلص	Extract
مستخلص الخميرة	Yeast extract
مستدام	Sustainable
المستشع	Fluorescent
مستعمرة	Colony
مستعمرة مختلفة أو متغيرة أو مغايرة	Variant colony
المستنسخ	Clone
مستويات غير محددة	Non-limiting levels
مشبعة	Saturated
مشتق	Derivative
المصافي الحيوية أو البيولوجية	Biorefineries
مصدر غذائي أو مادة خام	Feedstock
المصنع التجريبي	Pilot plant
المضاد للبكتيريا	Antibacterial
المطفر بالنسبة للمالتوز	Maltogenic
المطهرات	Antiseptics
المعالجات التآزرية	Synergistic treatments
المعالجة الجينية أو المعالجة الوراثية	Genetic manipulation
المعالجة الروبوتية	Robotic handling
المعاملة النهائية أو معاملات المصب (عمليات بعد التخمير)	Downstream processing
المعاملة أو المعالجة	Processing
المعايرة العكسية	Back-titration
معدل	Frequency
معدل التخفيف	Dilution rate
معدل التفاعل	Reaction rate
معدل النمو النوعي	Specific growth rate

obeikandl.com

Recombinant	المعدل أو المؤتلف
Feed rate of medium	معدل تغذية البيئة
Infectious	معدي
Gastrointestinal	المعدية المعوية
Suspended	معلق
Fluorescent biological labels	المعلمات البيولوجية المستشعة
Bio-Informatics	المعلوماتية الحيوية
Nutraceuticals	المغذيات
Micronutrients	المغذيات الدقيقة
Coleoptera	مغمدات الأجنحة
Denaturants	مغيرات الطبيعة
Ablative reactor	مفاعل الجر
Bioreactor	المفاعل الحيوي
Fluidized bed reactor	مفاعل الوسادة المتخلخلة
Packed bed reactor	مفاعل الوسادة المعبأة
Differential reactor	مفاعل تفريقي
Stirred reactors	مفاعلات التقليب
Cross-resistance	المقاومة المنتقلة
Multi-drug resistance	المقاومة للأدوية المتعددة
Scientific Abstract	ملصق علمي
Biocolorants	الملونات الحيوية
Innate immunity	المناعة الفطرية
Acquired immunity	المناعة المكتسبة
Crude product	المنتج الخام
End-product	المنتج النهائي
By-product	منتج ثانوي

obeikandl.com

منتج مكرر أو منقي	Refined product
منتجات الأيض الأولي	Primary metabolites
منتجات الأيض الثانوي	Secondary metabolites
منتجات تحلل البروتين	Protein hydrolysate
منحدر	Slope
منذ البداية	ab initio
منطقة الحلزون في الوضع ألفا	Alpha-helix region
المنفحة	Rennet
منفحة معدة العجل	Calf stomach rennet
منهي	Terminator
المهجنات المخلقة حيوياً	Biosynthetic hybrids
مهدبة الأجنحة	Thysanoptera
مواد الاستخلاص	Extractives
المواد الذائبة والغروية	Dissolved and Colloidal substances (DCS)
المواد الكاشطة	Abrasives
المواد المتحللة	Decaying matter
المواد المحلية	Sweeteners
المواد المذابة	Solutes
المواد المقللة للتوتر السطحي	Surfactants
المواد الوسيطة	Mediators
مواد ماصة	Sorbents
مواد محبة للماء (تذوب في الماء)	Hydrophilic
المؤسترة	Esterified
مؤشرات	Markers
الموصف أو المعلم	Labelled
الموقع النشط للإنزيم	Active site

obeikandl.com

المؤكسدات	Oxidants
مولد الجسم المضاد	Antigen
مولد طيفي	Fluorogenic/Fluorophore
مولد لوني	Chromogenic/Chromophore
المؤنسنة	Humanized
ميكانيكا الكم	Quantum mechanics

ن

الناقل	Vector
ناقل أو دعامة	Carrier
النباتات ثنائية الحول	Biennials
نتوءات خارجة	Pick outs
نجيمات	Rosettes
نخاع العظم	Bone marrow
نزح المياه التناضحي	Osmotic dewatering
نزع اللحاء	Deparking
نزع الماء	Anhydrobiosis
نزع مجموعة الكربوكسيل	Decarboxylation
النشاط المضاد للكوكسيديا	Coccidiostat activity
النشاط النوعي	Specific activity
نشاط داخل الجسم الحي (داخل اخلايا)	In vivo activity
نشاط مضاد للالتهابات	Anti-inflammatory activity
نشاط مضاد للتجلط أو التخثر	Antithrombotic activity
النشاط واسع المدى	Broad-Spectrum activity

obeikandl.com

نصفية العدد الكروموسومي في النواة	Haploid
النطاق الكبير أو النطاق الصناعي	Large-scale
نظام فحص	Screening protocol
نظائر	Analogs
النظائر الضوئية	Enantiomer
نظرية تعدد الأشكال	Pleomorphism theory
نظم التحويل الحيوي ذات تفاعلات الأكسدة والإختزال	Redox bioconversion systems
النظم والمكونات المنمنمة	Miniaturized systems and components
النظير المشع	Radioisotope
النفاذية	Permeability
نقطة التعادل الكهربية	Isoelectric point
نقطة سكب	Pour point
نقع الدعامات القلبية	Stent impregnation
نقل الدم	Transfusion
النقل العصبي	Neurotransmission
نقل الكتلة	Mass transfer
نقي المتشابهات	Enantiopure
نكليوزيدات	Nucleosides
نماذج تخيلية	Virtual models
النمذجة	Modeling
النمو ثنائي المرحلة	Diauxic growth
النموذج الأولي	Prototype
النهاية–إن	N-Terminus
نيوكليوتيدات النكهة	Flavor nucleotides

obeikandl.com

هـ

هجوم محب للنواة	Nucleophilic attack
هجين	Hybrid
هندسة الإنزيمات	Enzyme Engineering
الهندسة الأيضية	Metabolic engineering
الهندسة الجزيئية	Molecular engineering
الهندسة الحيوية	Biochemical engineering
هوائية	Aerobic

و

وحدة	Unit
وحدة بناء أو تخليق	Synthon
وحدة بنائية	Monomer
وحدة فرعية، وحيدي أو وحيدة	Subunit
الوراثة الجزيئية	Molecular genetics
الورم الخبيث	Sarcoma
ورم ويلمس	Wilms tumor
الوزن الجاف للخلايا	Cell dry weight
وعاء التخمير	Fermentation vessel
وقت الدفعة أو وقت التخمير	Batch time
وقت أو زمن التضاعف	Doubling time
الوقود الحيوي	Biofuel

obeikandl.com

ي

Dimerized	يتحد مع جزيء آخر
Deficient	يفتقر إلى

ثانياً: إنجليزي – عربي

A

ab initio	منذ البداية
Ablative reactor	مفاعل الجر
Abrasives	المواد الكاشطة
Absolute working pressure	ضغط العمل المطلق
Acetyl-CoA	أسيتيل–العامل المساعد أ
Acid stability	الثبات في الأحماض
Acidification	التحمض
Acidulant	مادة تعطي الطعم اللاذع
Acquired immunity	المناعة المكتسبة
Actinomycetes	الأكتينوميسيتات
Activated sludge	الحمأة المنشطة
Active site	الموقع النشط للإنزيم
Actue myocardial infarction	احتشاء عضلة القلب الحاد
Acylation	أسيلة
Adjuncts	المساعدات
Adsorbent	المادة المدمصة
Adsorption	إدمصاص أو امتزاز
Aerobic	هوائية

obeikandl.com

Affinity	الإنجذاب
Affinity chromatography	الفصل اللوني الانجذابي
Aggregarted	متجمعة
Agitation tip speed	سرعة طرف المقلب
Agricultural antifungal agents	العوامل المضادة للفطريات الزراعية
Air sparger	ضاخ الهواء
Alcohol	الكحول
Alkaloids	القلويدات
Alkalophilic	المحبة القلوية العالية
Alpha-helix region	منطقة الحلزون في الوضع ألفا
Aluminum overload	تراكم الألمنيوم
Amino acid residues	مجموعات الأحماض الأمينية
Amino acid substitutions	استبدالات الأحماض الأمينية
Amorphous	غير متبلورة
Amphibolic reactions	التفاعلات الهدمية البنائية (ثنائية الطبيعة)
Amphipathic	ثنائية الطبيعة تجاه الماء
Anabolic reactions	التفاعلات البنائية
Anaerobic	لاهوائية
Analogs	نظائر
Anaplerotic flux	المسار الوسطي
Anemia	فقر الدم
Angioplasty	القسطرة
Anhydrobiosis	نزع الماء
Anions	الأنيونات
Antagonistic effect	التأثير المضاد
Antibacterial	المضاد للبكتيريا

obeikandl.com

Antibody	الجسم المضاد
Antigen	مولد الجسم المضاد
Antihelmintics	طاردات الطفيليات
Anti-inflammatory activity	نشاط مضاد للالتهابات
Antiparasitic agents	العوامل المضادة للطفيليات
Antiseptics	المطهرات
Antithrombotic activity	نشاط مضاد للتجلط أو التخثر
Aphrons	فقاعات الغاز الدقيقة
Arithmetic mean roughness	متوسط الخشونة الحسابي
Arthropod parasites	الطفيليات المفصلية
Aspartic acid	حمض الأسبارتيك
Association analysis	التحليل الجماعي
Asymmetric	غير المتماثلة
Atherosclerosis	تصلب الشرايين
Atopic dermatitis	التهاب الجلد الإكزيمي
Attenuated	تم إضعافها
Atypical	غير عادية
Automated machines	الآلات المؤتمتة
Auxotroph strain	الأوكسوتروف (سلالة غير قادرة على إنتاج مركب عضوي معين)
Axial dispersion	التشتت المحوري
Axonemal beating	الضربات المحورية

B

Bacillus bacteria	البكتيريا العصوية
Background reactions	تفاعلات الخلفية
Backstaining	درجة الصبغ الرجعية

obeikandl.com

Back-titration	المعايرة العكسية
Baculoviruses	الفيروسات العصوية
Baffles	صدادات
Bagasse	تفل قصب السكر (المصاصة)
Batch culture	مزرعة على دفعة واحدة
Batch feeding	تغذية على دفعات
Batch time	وقت الدفعة أو وقت التخمير
Beatability	قابلية الطرق
Biennials	النباتات ثنائية الحول
Bioadhesion	الالتصاق الحيوي
Bioavailability	التوفر الحيوي
Biocatalysis	التحفيز البيولوجي أو التحفيز الحيوي
Biocatalyst	المحفز الحيوي
Biochemical engineering	الهندسة الحيوية
Biocolorants	الملونات الحيوية
Biocompatability	التوافق الحيوي
Bioconversion	التحويلات الحيوية
Biodegradable	قابل للتحلل الطبيعي أو الحيوي
Biodegradation	التحلل الحيوي
Biodiversity	التنوع البيولوجي أو الحيوي
Bioethanol	الكحول الإيثيلي الحيوي
Biofilms	الأغشية الحيوية
Biofuel	الوقود الحيوي
Bioherbicides	مبيدات الأعشاب الحيوية
Bio-Informatics	المعلوماتية الحيوية
Bioinsecticides	مبيدات الحشرات الحيوية

obeikandl.com

Biomass	الكتلة الحيوية
Biomass balance	توازن الكتلة الحيوية
Bioplastics	البلاستيكات الحيوية
Bioprocess	العملية الحيوية
Bioreactor	المفاعل الحيوي
Biorefineries	المصافي الحيوية أو البيولوجية
Biorepulsion	التنافر الحيوي
Biosensors	الحساسات الحيوية
Biosurfactants	المستحلبات الحيوية
Biosynthesis	التخليق أو التكوين الحيوي
Biosynthetic hybrids	المهجنات المخلقة حيوياً
Biosynthetic pathway	المسار التخليقي الحيوي
Biotransformation	التحويلات الحيوية
Bleaching	التبييض
Bleaching effluents	متدفقات التبييض
Blend	مزيج
Blood clotting	تخثر الدم
Bone marrow	نخاع العظم
Bottom fermentation	التخمير السفلي
Boundary conditions	الظروف المحيطة
Brightness reversion	ارتداد اللمعان
Broad-Spectrum activity	النشاط واسع المدى
Broth	محلول أو بيئة التخمر
Bulk chemicals	الكيماويات الضخمة (تنتج في أحجام كبيرة)
By-product	منتج ثانوي

obeikandl.com

C

Calf stomach rennet	منفحة معدة العجل
Calorific value	قيمة توليد الحرارة
Capillary electrophoresis	الكهربية الشعرية الموازية
Capillary interactions	التفاعلات الشعرية
Capillary water	الماء الشعري
Capnophilic	تنمو في وجود ثاني أكسيد الكربون
Capsid	القفيصة
Carbochemistry	كيمياء الكربون
Carbohydrates	الكربوهيدرات (السكريات)
Carbon nanotubes	أنابيب الكربون النانوية
Carboxylation	إضافة مجموعة الكربوكسيل
Cardiovascular diseases	الأمراض القلبية الوعائية
Carrier	ناقل أو دعامة
Cascade	تتابع
Catabolic reactions	التفاعلات الهدمية
Catabolite repression	الكبح الهدمي
Cations	الكاتيونات
Cell debris	بقايا الخلايا
Cell differentiation	تمايز الخلايا
Cell dry weight	الوزن الجاف للخلايا
Cell line	خط خلوي
Cell lines	خطوط الخلايا
Cell mass	كتلة الخلايا
Cell permeabilization	تنفيذ الخلية (تعديل الجدار الخلوي)

obeikandl.com

Cell vacuoles	تجويفات الخلية
Cell-free environment	بيئة خالية من الخلايا
Cellulose	السيليولوز
Cell-wide measurements	القياسات الخلوية الواسعة
Centrifugal action	عمل الطرد المركزي
Centrifugation	الطرد المركزي
Chelation	الحجب
Chelator	العامل الحاجب
Chemical acylation	الأسيلة الكيميائية (إدخال مجموعة الأسيل)
Chemical catalyst	المحفز الكيميائي
Chemical structure elucidation	توضيح التركيب الكيميائي
Chemical synthesis	التخليق الكيميائي
Chemo-regio-stereo-selective manner	طريقة إنتقاء كيميائية/ اتجاهية/ فراغية
Chill-proofing of beer	العتيق البارد للبيرة
Chiral ligand	الرابط الفراغي
Chirality	التركيب الفراغي
Cholrinated solvents	المذيبات المكلورة
Chromatography	الفصل اللوني
Chromogenic/Chromophore	مولد لوني
Chromooligopeptide	كروموأوليجوببتيد
Chromosome	الكروموسوم أو الصبغي
Chronic granulomatous disease	مرض الورم الحبيبي المزمن
Clarification steps	خطوات الترويق
Clean-in-place	التنظيف-في-المكان
Clinical test	التجارب السريرية
Clone	المستنسخ

obeikandl.com

Cloning	الاستنساخ
Cloning vector	عامل أو ناقل الاستنساخ
Clotting agents	عوامل تخثر الدم
Coccidiostat activity	النشاط المضاد للكوكسيديا
Codon	الشفرة
Cofactor generation	توفير أو تجديد العوامل المساعدة
Cofactors	العوامل المساعدة
Coleoptera	مغمدات الأجنحة
Colloids	الغرويات
Colonic carcinogenesis	تسرطن القولون
Colony	مستعمرة
Combinatorial active site saturation test (CASTing)	اختبار تشبع الموضع النشط الاندماجي
Combinatorial biosynthesis	التخليق الحيوي الاندماجي
Combi-synthesis	التخليق التجميعي
Competitive inhibition	التثبيط التنافسي
Complexes	المتراكبات
Concerted feedback inhibition	التثبيط الرجعي المنسق
Conformational effects	التأثيرات التشكيلية
Conidial state	الطور الغبيري (طور تكوين الكونيديا)
Conjugated	المترافقة
Continuous feeding	التغذية المستمرة
Convective flow	تدفق الحمل الحراري
Conversion efficiency	كفاءة التحويل
Co-Polymerization	البلمرة التعاونية
Corn steep liquor	شراب منقوع الذرة
Corn wet milling indutsry	صناعة الطحن الرطب للذرة

obeikandl.com

Coronary artery disease	مرض الشريان التاجي
Coronary heart diseases	أمراض القلب التاجية
Correct signal peptide cleavage	إنقسام الببتيد صحيح الإشارة
Coupled reaction	التفاعل المزدوج
Crosslinked enzyme aggregates	مجاميع الإنزيم المرتبطة
Crosslinked enzyme crystals	بلورات الإنزيم المرتبطة
Cross-resistance	المقاومة المنتقلة
Crude product	المنتج الخام
C-terminal domain	مجال نهاية الكربون
Culture filtrate	رشيح المزرعة
Cumulative metabolic heat	الحرارة الأيضية التراكمية
Cyanation	الأسينة (إدخال مجموعة السيانيد)
Cyclic peptides	الببتيدات الحلقية
Cytoplasmic membrane	غشاء سيتوبلازمي

D

Da	دالتون
Debranching enzymes	الإنزيمات مفككة التفرعات
Decanter or scroll centrifuge	جهاز الطرد المركزي الساكب أو الحلزوني
Decarboxylation	نزع مجموعة الكربوكسيل
Decaying matter	المواد المتحللة
Deep vein thrombosis	جلطة الأوردة العميقة
Deficient	يفتقر إلى
Deforestation	إزالة الغابات
Delignification	إزالة اللجنين
Denaturants	مغيرات الطبيعة

obeikandl.com

Deparking	نزع اللحاء
Depressurization	خفض أو إزالة الضغط
Deregulating	الإخلال بتنظيم
Derivative	مشتق
Desiccation	التجفيف تحت ضغط
Desorption	عدم الإدمصاص أو الإمتزاز
Desymmetrization	إلغاء أو نزع التناظر
Diastereomer crystallization	البلورة ثنائية المتشابهات
Diatomaceous earth	الثري الدياتومي
Diauxic growth	النمو ثنائي المرحلة
Differential reactor	مفاعل تفريقي
Diffusivity	انتشارية
Dilution rate	معدل التخفيف
Dimerized	يتحد مع جزيء آخر
Diploid	زوجية العدد الكروموسومي في النواة
Dipole interactions	التفاعلات ثنائية القطب
Diptera	الحشرات ذوات الجناحين
Disaccharide	السكر الثنائي
Disc stack centrifuge	جهاز الطرد المركزي ذو الأقراص المتراصة
Dispersion	الانتشار
Displacement chromatography	الفصل اللوني الإزاحي
Dissolved and Colloidal substances (DCS)	المواد الذائبة والغروية
Distiller's strains	سلالات التقطير
Dividends	أرباح الأسهم
DNA	الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي (الدنا)
DNA ligase	الإنزيم اللاحم للحمض النووي

obeikandl.com

Dose-associated toxicity	السمية المرتبطة بالجرعة
Double helix	اللولب المزدوج
Double-stranded structure	التركيب ثنائي الخيط
Doubling time	وقت أو زمن التضاعف
Downstream processing	المعاملة النهائية أو معاملات المصب (عمليات بعد التخمير)
Duplication	التضاعف
Dysfunction	الإختلال الوظيفي

E

Eco-Efficiency	الكفاءة البيئية
Edible	القابلة للأكل
Effectiveness	الفعالية
Efflux	التدفق من داخل الخلية إلى خارج الخلية
Electrodialysis	الفصل الغشائي الكهربائي
Electrolyte	المحلول المنحل بالكهرباء
Elucidation	التوضيح
Emission	الإنبعاث
Emulsification	الاستحلاب
Emulsifier	المستحلبات
Enantiomer	النظائر الضوئية
Enantiopure	نقي المتشابهات
Enantioselective esterification	الأسترة الاختيارية للنظائر الضوئية
Enantioselectivity	انتقائية المتشابهات
Encapsulation	التغليف
Encoding	الترميز أو التشفير
Endonucleases	الإنزيمات الداخلية المحللة للنيوكلوتيدات

obeikandl.com

Endophytes	الفطريات الداخلية
Endosperm	السويداء أو الجرثومة الداخلية
End-point measurements	القياسات عند نقطة النهاية
End-product	المنتج النهائي
Enriched	مخصب
Enteral nutrition	التغذية المعوية
Enteropathogens	الجراثيم الداخلية
Enthalpy	محتوي الطاقة
Entrapment	الانحباس
Entropy	خصائص الديناميكية الحركية
Enyzmatic specificity	تخصصية الإنزيم
Enyzme variants	متغيرات الإنزيم
Enzymatic hydrolysis	التحلل الإنزيمي
Enzyme	الإنزيم
Enzyme complex	متراكب إنزيمي
Enzyme denaturation	تغير طبيعة الإنزيم
Enzyme Engineering	هندسة الإنزيمات
Enzyme-mediated reactions	التفاعلات التي تتم بواسطة الإنزيمات
Error-prone polymerase chain reaction	تفاعل تسلسل البلمرة عرضي الخطأ
Escherichia coli	بكتيريا إيشيريشيا القولون
Essential amino acid	الحمض الأميني الأساسي
Ester bonds	الروابط الإستيرية
Esterified	المؤسترة
Ethylene	الإيثيلين
Eucaryotes/Eukaryotes	الكائنات حقيقية النواة
Eutrophication	زيادة المواد المغذية

obeikandl.com

Ex ante	مسبق
Excretion	الإفراز
Exothermic	تفاعل طارد للحرارة
Exponential growth phase	مرحلة النمو الأسي أو الإطرادي أو التصاعدي
Expression	التعبير عن الجينات في نواتجها
Expression cassette	شريط التعبير
Extracellular	خارج الخلية
Extract	مستخلص
Extraction	الاستخلاص
Extractives	مواد الاستخلاص
Extremophiles	كائنات تنمو في الظروف القاسية

F

Fatty acid	الحمض الدهني
Feed rate of medium	معدل تغذية البيئة
Feedback inhibition	التثبيط الرجعي
Feedback regulation	التنظيم الرجعي
Feedstock	مصدر غذائي أو مادة خام
Fermentable	قابلة للتخمير
Fermentation	التخمير
Fermentation microbiology	علم الأحياء الدقيقة (ميكروبيولوجي) في التخمير
Fermentation vessel	وعاء التخمير
Fermenter	المخمر
Fibril	لييفات
Fibrillar structures	التراكيب الليفية
Film	طبقة رقيقة

obeikandl.com

Filtrate	رشيح
Filtration process	عملية الترشيح
Final plateau	الصعيد النهائي
Fine chemicals	الكيماويات الدقيقة (التي تنتج بكميات ضئيلة)
Flavor nucleotides	نيوكليوتيدات النكهة
Flex-fuel Vehicle	المركبات ثنائية الوقود
Floatation deinking	إزالة الأحبار العائمة
Flocculating agents	عوامل التلبد
Flocculent	المادة المتجمعة أو المتلبدة
Flow cytometry	التدفق الخلوي
Fluidized bed reactor	مفاعل الوسادة المتخلخلة
Fluorescent	المستشع
Fluorescent biological labels	المعلمات البيولوجية المستشعة
Fluorogenic/Fluorophore	مولد طيفي
Food chain	السلسلة الغذائية
Foreign genes	جينات خارجية
Fractional crystallization	التبلور التجزيئي
Fractional distillation	التقطير التجزيئي
Fractionation	التجزئة
Freeze tolerance	تحمل التجميد
Frequency	معدل
Friction	الإحتكاك
Fruiting bodies	أجسام الاثمار
Functional groups	المجموعات الوظيفية

obeikandl.com

G

g/l	جم/ ل (جرام/ لتر)
Gas stripping	التجريد الغازي
Gasification	التحويل للغاز
Gasifier	جهاز التغويز (التحويل إلى الغاز)
Gastrointestinal	المعدية المعوية
Gastrointestinal tract	القناة المعدية المعوية (القناة الهضمية)
Gel filtration	ترشيح الهلام
Gene annealing	تهجين الجينات
Gene expression	التعبير الجيني
Gene order	ترتيب الجينات
Gene replication	تكرار الجين
Gene sequence	تسلسل الجيينات
Gene shuffling	خلط الجينات
Gene site-saturation mutagenesis	التطفير التشبعي لموقع الجين
Genetic code	الشفرة الوراثية
Genetic manipulation	المعالجة الجينية أو المعالجة الوراثية
Genetic recombinantion	التعديل الجيني أو الوراثي
Genetically modified crops	المحاصيل المعدلة وراثياً
Genome	الخريطة الوراثية الكاملة (الجينوم)
Genus	جنس
Germ	جرثومة
Gluconic acid	حامض الجلوكونيك
Glucose	سكر الجلوكوز
Glucose isomerase	إنزيم مصاوغة الجلوكوز

obeikandl.com

Glutamate	الجلوتامات
Glycolysis	تحليل الجلوكوز
Glycosylated	جليكوزيلاتية
Glycosylation	الإرتباط بمجموعة الجليكوزيل
Grafting	التطعيم
Graft-versus-host disease	مرض الدعامة-مقابل-العائل
Gram-negative bacteria	البكتيريا السالبة لصبغة جرام
Gram-positive bacteria	البكتيريا الموجبة لصبغة جرام
Greenhouse	الاحتباس الحراري
Grit number	رقم الحبيبات
Gut Microbiota	المحتوي الميكروبي للأمعاء

H

Half-life time	فترة عمر-النصف
Halophilic bacteria	البكتيريا المحبة للملوحة
Haploid	نصفية العدد الكروموسومي في النواة
Harvest stream	تيار الحصاد
Haze control	التحكم بدرجة التعكير
Headspace	الحيز الرأسي
Heat exchange	التبادل الحراري
Heat Exchanger	مبادلات الحرارة
Hemophilia	سيلان الدم
Heterologous proteins	البروتينات غير المتشابهة
Hexoses	السكريات السداسية
High-cell density	عالية الكثافة من الخلايا
Higher organisms	الكائنات الأرقي أو الراقية

obeikandl.com

Highly mechnaized	عالية الميكنة
High-pressure homogenization	التجانس تحت ضغط عالي
Homogeneous aqueous media	البيئات المائية المتجانسة
Homogenization	عملية التجانس
Host	العائل أو الكائن المضيف
Human serum albumin	بروتين ألبومين المصل البشري
Humanized	المؤنسنة
Hybrid	هجين
Hydration	إضافة الماء
Hydrocarbons	مركبات هيدروكربونية
Hydrolysate	المحللات
Hydrolytic enzymes	الإنزيمات المحللة
Hydrophilic	مواد محبة للماء (تذوب في الماء)
Hydrophobic interaction chromatography	الفصل اللوني ذو التفاعلات الكارهة للماء
Hydrophobic membrane	غشاء كاره للماء
Hydrophobicity	طبيعة التفاعل الكاره للماء
Hydroxylation	إضافة مجموعة الهيدروكسيل
Hygiene	الصحة والنظافة
Hymenoptera	غشائية الأجنحة
Hyperglycemia	ارتفاع سكر الدم
Hypertension	ارتفاع ضغط الدم
Hypothermia	انخفاض حرارة الجسم

I

Idiolites	الإيديوليتات
Idiophase	مرحلة إنتاج نواتج الأيض الثانوي

obeikandl.com

Idiotroph	إيديوتروف
Immiscible	غير القابلة للامتزاج
Immobilized form	صورة محملة أو مقيدة
Immortal cancerous	خلايا سرطانية خالدة
Immunosuppressants	مثبطات المناعة
Immunotherapy	العلاج المناعي
Impeller blades	شفرات التقليب
Impellers	قلابات المخمر
Impregnation	تشريب
Impurities	شوائب
In silico	باستخدام البرامج الحاسوبية
In situ	مباشرة في الموقع
In vitro	في التجارب المعملية أو في المختبر (خارج الخلايا)
In vivo activity	نشاط داخل الجسم الحي (داخل اخلايا)
Inclusion bodies	أجسام مشتملة
Incrusts	التقشر الداخلي
Industrial Biotechnology	التقنية الحيوية الصناعية
Infectious	معدي
Infusion	حقن السوائل
Innate immunity	المناعة الفطرية
Inoculation	الحقن أو التلقيح
Inoculum	اللاقح أو البادئ أو الحاقن
Insoluble	غير قابل للذوبان
Integration	إدماج أو تكامل
Interface	السطح البيني
Interfacial inactivation	التثبيط البيني

obeikandl.com

Interfacial tension	توتر السطح البيني
Intermediary metabolism	الأيض الوسيط
Intermediate	مركب وسيط
Intermittent feeding	التغذية المتقطعة
Intermolcular bonds	الروابط داخل الجزيئات
Interstitial spaces	المساحات الخلالية
Intracellular	داخل الخلية
Intramolcular bonds	روابط بين الجزئيات
Intrinsic	حقيقي
Invertebrates	اللافقاريات
Ion Exchange	التبادل الأيوني
Ion Exchange chromatograpgy	الفصل اللوني التبادلي للأيونات
Ionic strength	أيونية المحلول
Ionophores	أيونوفورات
Iron-overload disease	مرض تراكم الحديد
Isoelectric point	نقطة التعادل الكهربية
Isoptera	متساوية الأجنحة
Iterative saturation mutagenesis	التطفير التشبعي التكراري

K

Kefyr	الكفير
Ki	ثابت تثبيط الإنزيم
Kinematic viscosity	اللزوجة الحركية
Kinetics	حركية
Km	ثابت التفاعل
Knocking out	سبر تسلسل الجين

obeikandl.com

Koji	الكوجي
Koumiss	الكوميس

L

Labelled	الموصف أو المعلم
Lactose	سكر اللاكتوز
Lag phase	الطور التأخري
Laminar flow	التدفق الصفحي
Large-scale	النطاق الكبير أو النطاق الصناعي
Latent vaporization heat	حرارة التبخر الكامنة
Leaky plasma membrane	غشاء البلازما الراشح
Lepidoptera	قشرية الأجنحة
Ligation	الالتحام
Lignin	اللجنين
Lipid interestrification	الأسترة الداخلية للدهون
Lubricant	مادة تشحيم
Lubricating oils	زيوت التشحيم
Lyophilized cells	الخلايا المجفدة
Lysine-HCl	حمض الليسين-هيدروكلوريك

M

Macrolide	كبيرة الحلقات
Macromolecules	جزيئات كبيرة
Magnetic cell sorting	فرز الخلايا المغناطيسي
Magnetite	أكسيد الحديد الأسود (الماجنتيت)
Maltogenic	المطفر بالنسبة للمالتوز

obeikandl.com

Mammalian cells	الخلايا الثديية (خلايا الحيوانات الثديية)
Mammalian polypeptides	البروتينات الكثيرة الثديية
Markers	مؤشرات
Mass transfer	نقل الكتلة
Massive parallel signature sequencing	التسلسل التوقيعي المتماثل الضخم
Mechanical pulping	الاستخلاص الميكانيكي
Mechanism	آلية أو كيفية
Media	البيئات الغذائية
Mediators	المواد الوسيطة
Medium	البيئة الغذائية
Medium pH	درجة الرقم الهيدروجيني لبيئة الزراعة
Membrane	الغشاء
Membrane microfiltration	الترشيح فائق الغشائية
Membrane processes	العمليات الغشائية
Membrane strain	جهد الغشاء
Membrane-bound enzymes	الإنزيمات المرتبطة بالغشاء
Meningitis	التهاب السحايا
Meso-compound	مركب غير نشط ضوئياً
Metabolic engineering	الهندسة الأيضية
Metabolic flux	تدفق الأيض
Metabolism	التمثيل الغذائي (الأيض)
Metabolizable energy	الطاقة التمثيلية
Methylation	مثيلة (إضافة مجموعة الميثيل)
Methylotrophic	كائنات تستطيع استخدام مركبات الميثيل (ميثيلوتروفيك)
Micro RNAs	الأحماض النووية الريبوزية (الرنا) الدقيقة

obeikandl.com

Microaerophilic	الكائنات المفضلة لكميات دقيقة (ضئيلة جداً) من الهواء
Micro-algae	الطحالب الدقيقة
Microbial culture	مزرعة أو سلالة ميكروبية
Microemulsions	المستحلبات الدقيقة
Microenvironment	بيئة دقيقة
Microfiltration	الترشيح الدقيق
Micromolecules	الجزيئات الصغيرة
Micronutrients	المغذيات الدقيقة
Microorganisms	الكائنات الحية الدقيقة
Microscope	مجهر
Microscopic fuzz	الزغب المجهري
Microscopist	متخصص في المجهر
Microtiter plates	الأطباق دقيقة المستوى
Microtubules	الأنيبيبات الدقيقة
Milk whey	شرش اللبن
Mill operation	عملية الطحن
Mineralization	التمعدن
Miniaturized systems and components	النظم والمكونات المنمنمة
Mitotic cells	الخلايا التفتلية
Mixed culture processes	عمليات الزراعة المختلطة أو المشتركة
Mode of action	كيفية التأثير
Modeling	النمذجة
Moiety	الشاردة
Molasses	الدبس الناتج من صناعة السكر
Molecular breeding	التكاثر الجزيئي
Molecular engineering	الهندسة الجزيئية

obeikandl.com

Molecular genetics	الوراثة الجزيئية
Monoclonal antibodies	الأجسام المضادة أحادية النسيلة
Monolithic supports	الدعامات المتجانسة
Monomer	وحدة بنائية
Monoseptic fermentation	عملية تخمير أحادية الكائن الحي
MRI contrast enhancement	تعزيز النقيض باستخدام الرنين المغناطيسي
Multi-drug resistance	المقاومة للأدوية المتعددة
Multiplication	التضاعف
Multivariate statistical analysis	التحليل الإحصائي متعدد المتغيرات
Mutagenesis	التطفير (احداث الطفرة)
Mutant	الكائن المطفر أو المعدل
Mutation	الطفرة الوراثية
Mutational biosynthesis	التخليق التطفيري الحيوي
Myristoylation	تعديل البروتين أثناء عملية الترجمة

N

NADP	فوسفات نيكوتين أميد أدينين داي نيكليوتيد المؤكسد
NADPH	فوسفات نيكوتين أميد أدينين داي نيكليوتيد المختزل
Neuropeptide	ببتيد عصبي
Neurotransmission	النقل العصبي
Non-carcinogenic	غير مسرطن
Non-covalent immobilization	التقييد غير التساهمي
Non-covalently bound	المرتبطة لا تساهمياً
Non-flamable	غير قابل للإشتعال
Non-Hodgkin's lymphoma	الأورام اللمفاوية غير-الهودجكينية
Non-limiting levels	مستويات غير محددة

obeikandl.com

Non-mutagenic	غير مطفر
Non-native	غير أصلية
Non-polar	غير قطبية
N-Terminus	النهاية-إن
Nucleation	ارتباط أنوية جزيئات الماء
Nucleophilic attack	هجوم محب للنواة
Nucleosides	نكليوزيدات
Nutraceuticals	المغذيات

O

Octane rating	درجة الأوكتان
Oleate	أوليئات
Oleo-chemicals	الكيماويات الزيتية الوسيطة
Onchocerciasis	مرض العمى النهري الإنساني
Oncogene	الجين الورمي أو السرطاني
On-line control	التحكم المباشر
Operons	أوبيرونات
Oral adminstration	التناول عن طريق الفم
Organ transplantation	زرع الأعضاء
Organelles	العضيات
Organoleptic characteristics	خصائص حسية
Osmotic dewatering	نزح المياه التناضحي
Osmotic shock	الصدمة التناضحية
Outflow	التدفق الخارج
Overexpression	التعبير المفرط
Overproudction	زيادة الإنتاجية المفرطة

obeikandl.com

Oxidants	المؤكسدات
Oxidized compound	مركب متأكسد
Oxygenate	مركب أوكسجيني

P

Packed bed reactor	مفاعل الوسادة المعبأة
Palmitylation	الارتباط بالأحماض الدهنية
Parallelization	عملية الموازاة
Parent molecule	الجزيء الأم أو الأصلي
Parentally administered	عن طريق الحقن
Parenteral nutrition	التغذية عن طريق الحقن
Particle erosion	تآكل الجسيمات
Partition effects	تأثيرات تقسيمية
Pasturization	البسترة
Pathogenesis	المرضية
Pathogens	الكائنات الممرضة
Pentose	سكر خماسي
Peptide bond	الرابطة الببتيدية
Perfusion batch culture	زراعة الدفعة الواحدة ذات النضح
Peripheral vascular diseases	أمراض الأوعية الدموية الطرفية
Periplasmic space	المحيط بعد البلازميدي
Permeability	النفاذية
Permeate	محلول الرشيح
Peroxidation	الأكسدة الفوقية
Perstraction	الاستخلاص التنفيذي
Phage	الفيروس البكتيري (فاج)

obeikandl.com

Phenolic resins	راتنجات الفينول
Phenylalanine	فينيل ألانين
Phospholipids	الدهون الفوسفاتية
Phosphorylation	الفسفرة (إدخال مجموعة الفوسفات)
Photosynthesis	التمثيل أو البناء الضوئي
Physico-chemical properties	الخصائص الفيزيائية الكيميائية
Physico-chemists	الكيميائيين الفيزيائيين
Pick outs	نتوءات خارجة
Pigmentation	التصبغ أو التلون
Pilot plant	المصنع التجريبي
Pit membranes	الأغشية بين الأوعية الخشبية
Pituitary glands	الغدد النخامية
Pizoelectric	كهروضغطية
Plant growth stimulators	محفزات نمو النبات
Plasmid transformation	التحول البلازميدي
Pleomorphism theory	نظرية تعدد الأشكال
Poly electrolyte	محلول كهربائي متضاعف
Polycations	الكاتيونات الكثيرة
Polyene	عديد الروابط الثنائية
Polygeneration	تعدد التوليد أو الإنتاج
Polymer	عديد الوحدات
Polymerase chain reaction (PCR)	تفاعل البلمرة المتسلسل أو تسلسل البلمرة
Polymerase enzyme	إنزيم البلمرة
Polymorphism	تعدد أشكال
Polysaccharides	السكريات العديدة
Porous supports	الدعامات المسامية

obeikandl.com

Post-prandial	بعد الوجبات
Posttranslational modifications	التعديلات بعد عملية الترجمة
Pour point	نقطة سكب
Prebiotic	محفزة لنمو البكتيريا في الجهاز الهضمي
Preciptatnts	المرسبات
Precursor	مرادفات أو مواد أولية (مركبات تتفاعل لتنتج مركبات أخرى)
Pressurization	زيادة الضغط
Prevaporation	التبخير المسبق
Primary metabolites	منتجات الأيض الأولي
Probe	مسبار أو حساس
Procaryotes/Prokaryotes	الكائنات بدائية النواة
Process scale-up	تصعيد أو زيادة مستوى العملية
Processing	المعاملة أو المعالجة
Prodrugs	العقاقير المساعدة
Production titer	تركيز الإنتاج
Promotant	محفز
Promoter sequence	تسلسل الجينات البادئ
Promotor	البادئ
Protein coagulation	تخثر البروتين
Protein folding	طي البروتين
Protein hydrolysate	منتجات تحلل البروتين
Protein synthesis	تخليق البروتين
Protein unfolding	تكشف أو الغاء طي البروتين
Protein variants	بدائل أو متغيرات البروتين
Protein-free medium	البيئة الخالية من البروتين
Proteolytic processing	تجهيز أو معاملة البروتين

obeikandl.com

Protoplast	البروتوبلاست
Protoplast fusion	إدماج البروتوبلاست (إندونيكليزات)
Prototype	النموذج الأولي
Pseudo	الزائف
Pulping process	عملية الاستخلاص
Pumice stone	الحجر الإسفنجي
Pyroconversion	التحليل الحراري
Pyro-gasification	التحويل للغاز حرارياً
Pyrolyze	انحلال الكتلة الحيوية حرارياً

Q

Quantification	التحديد الكمي
Quantum mechanics	ميكانيكا الكم

R

R & D Policy (Research & Development)	سياسة البحث والتطوير
Radial thread	الألياف القطرية
Radicals	الشوارد أو الشقوق
Radioisotope	النظير المشع
Rate limiting reaction	تفاعل محدد للمعدل
rDNA	الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل
Reaction rate	معدل التفاعل
Reaction thermodynamics	الديناميكا الحرارية للتفاعل
Reactive	تفاعلي
Reactive extraction	الاستخلاص التفاعلي
Reactor headspace	مساحة سطح المفاعل

obeikandl.com

Recombinant	المعدل أو المؤتلف
Recombinant diagnostic kit	عدة تشخيصية للتعديل الوراثي
Recombinantion	التعديل
Recovery agent	عامل الاستخلاص أو الإسترداد
Recycling	إعادة التدوير
Redox bioconversion systems	نظم التحويل الحيوي ذات تفاعلات الأكسدة والإختزال
Reduced compound	المركبات المختزلة
Reductive amination	أمينة اختزالية (إدخال مجموعة أمين مع الاختزال)
Refined product	منتج مكرر أو منقي
Refractory layer	الطبقة المقاومة للصهر
Regioselectivity	انتقائية تعتمد على اتجاه التفاعل
Regulatory genes	جينات تنظيمية
Rejects	الرجيع
Relapsing fever	الحمى الإنتكاسية
Religation	إعادة التحام
Renaturation	إعادة الطبيعة
Rennet	المنفحة
Reproducibility	تكرار النتائج
Reproduction	التكاثر
Resistance genes	الجينات المقاومة
Respiratory syncytial virus	فيروس المخلوي التنفسي
Restenosis	الضيق الرجعي
Restriction enzymes	إنزيمات التقييد
Retractable sensore	الحساسات القابلة للسحب
Re-use	إعادة الاستخدام
Reverse micelles	المذيلات العكسية

obeikandl.com

Reversed phase chromatography	الفصل اللوني عكسي الطور
Ribosomes	الريبوسومات
Ring expansion reaction	تفاعل تمدد الحلقة
RNA	الحمض النووي الريبوزي (الرنا)
Robotic handling	المعالجة الروبوتية
Root mean square roughness	الجذر التربيعي لمتوسط الخشونة
Rosettes	نجيمات
Rotary drum vacuum filter	مرشح تفريغ الأسطوانة الدوارة
Rotation torque	عزم الدوران
RPM	لفة لكل الدقيقة
Ruminants	الحيوانات المجترة
Rupture disk	قرص التمزق

S

Saccharification	التسكر
Sake-yeast	الخميرة لغرض معين
Sanitation	الصحة العامة
Sarcoma	الورم الخبيث
Saturated	مشبعة
Saturation	التشبع
Scaffolds	سقالات التدعيم (دعامات النمو)
Scalability	زيادة المستوى
Scientific Abstract	ملصق علمي
Screening	الفرز والاختيار
Screening protocol	نظام فحص
Secondary metabolites	منتجات الأيض الثانوي

obeikandl.com

Semi-conductor	أشباه الموصلات
Semi-permeable membrane	غشاء شبه نفاذ
Semi-synthetic	شبه المخلقة
Set-aside land	الأرض المجنبة
Shake flasks	دوارق الهز (الدوارق المهتزة)
Shear-sensitive	الحساسة للإجهاد
Shelf-life	فترة عمر الرف (التخزين)
Sialylated	سياليلاتية
Side-chains	سلاسل جانبية
Siderophore	حامل للحديد
Simulated moving bed	محاكاة السرير المتحرك
Siphonoptera	عديمة الأجنحة
Site-directed mutagenesis	التطفيرات الموجهه-المكان
Sizing	التحجيم
Slope	منحدر
Solid-state cultures	زراعات الحالة الصلبة
Solubilization	الإذابة
Solutes	المواد المذابة
Solution	المحاليل
Solvation	انذياب
Solvents	المذيبات
Sonication	الصوتنة (التأثير بالموجات الصوتية)
Sorbents	مواد ماصة
Sour	حامضة
Sparged	إمرار الهواء
Sparging	ضخ الهواء

obeikandl.com

Sparingly soluble	شحيح الذوبان
Spark-ignition engines	محركات الإشعال بالشرارة
Spatial structures	تركيبات فراغية
Specific activity	النشاط النوعي
Specific growth rate	معدل النمو النوعي
Spetic shock	الصدمة الإنتانية
Sporulation	التجرثم (تكوين الجراثيم)
Spray-dried	المجففة بالرذاذ
Staggered Extension process	عملية التوسيع التعاقبي
Starch saccharification	تسكر النشا
Starter culture	المزرعة البادئة
Starting material	المادة البادئة
State of technology	حالة التقنية
Stationary growth phase	مرحلة النمو الثابتة
Stem cells	الخلايا الجذعية
Stent impregnation	نقع الدعامات القلبية
Stereoselectivity	الانتقائية المجسمة
Steric hindrance	العائق الفراغي
Sterilization-in-place	التعقيم-في-المكان
Stirred reactors	مفاعلات التقليب
Strain degeneration	تحلل السلالة
Strain specific	متخصص للسلالة
Streptococci	البكتيريا العنقودية
Streptomycetes	الإستربتوميسيتات
Stroke	السكتة الدماغية
Stromal tumor	الأورام اللحمية

obeikandl.com

Strongyloidiasis	داء الطفيليات الأسطوانية
Structural genes	الجينات التركيبية
Structural layer	الطبقة التركيبية
Sublimation	التسام
Submerged culture	طريقة الزراعة المغمورة
Submicron	تحت مستوى الميكرون
Substrate specificity	تخصصية وسط التفاعل
Subunit	وحدة فرعية، وحيدي أو وحيدة
Subzero	تحت درجة حرارة الصفر
Sugars	السكريات
Supercritical solvents	المذيبات ذات درجات الحرارة فوق الحرجة
Supernatant	المحلول الطافي
Supersaturation	التشبع الفائق
Supplements	إضافات
Supramolecular structures	التراكيب الجزيئية الفائقة
Surface culture	طريقة الزراعة السطحية
Surfactants	المواد المقللة للتوتر السطحي
Surrogates	البدائل
Suspended	معلق
Suspension culture	زراعة الخلايا المعلقة
Sustainability	الاستدامة
Sustainable	مستدام
Sweeteners	المواد المحلية
Symmetric	المتماثلة
Syndrome	متلازمة
Synergistic	تعاوني أو تآزري

obeikandl.com

Synergistic treatments	المعالجات التآزرية
Synthetic dyes	الأصباغ الاصطناعية
Synthon	وحدة بناء أو تخليق

T

Tandem repeats	تكرارات ترادفية
Tangential	تماسي
Targeted deletion	الحذف الاستهدافي
Tatuomerism	التوازن بين صورتي الكيتو (الألدهيد أو الكيتون) والإينول
Tenderizing of meat	تطرية اللحوم
Tensile strength	قوة الشد
Terminator	منهي
Terpenes	التربينات
Tertiary structure	التركيب الرباعي
Tetrasccharide	السكر الرباعي
Texture quality	جودة الملمس
Thermal denaturation	التدمير الحراري
Thermistor arrays	صفائف الثرمستور
Thermomechanical pulp	اللب الحراري الميكانيكي
Thermophilic	تنمو في درجة حرارة عالية
Thermoplastics	اللدائن الحرارية
Thermotolerant	تتحمل درجات الحرارة
Thickener	مثخن
Thrombolytics	محللات الجلطات
Thysanoptera	مهدبة الأجنحة
Tissue plasminogen	بلازمينوجين الأنسجة

obeikandl.com

Tissue transplant	زراعة الأنسجة
Top fermentation	التخمير العلوي
Topical preparation	مستحضراً موضعياً
Torque	عزم الدوران
Torrefaction	التحميص
Transcript expression	التعبير النسخي
Transesterification	الأسترة الناقلة
Transfusion	نقل الدم
Transgenic animals	الحيوانات المعدلة وراثياً
Transient tempelate	قوالب وقتية
Transition state	المرحلة الانتقالية
Transmembrane distillation	التقطير عابر الأغشية
Transposition mutagenesis	التطفير التحويلي
Tray Fermenter	المخمر ذو الأدراج
Trial-and-error	طريقة المحاولة والخطأ
Triglycerides	الشحوم الثلاثية
tRNA	الحمض النووي الريبوزي الناقل
Trypanosomiasis	داء المثقبيات
Tumor necrosis factor	عامل الموت الموضعي للورم
Turbulence	التيارات
Turnover number	عدد الدوران

U

Ultrafiltration	الترشيح الفائق
Unabataed	دون انقطاع
Unit	وحدة

obeikandl.com

Unsaturated	غير مشبعة
Uterocontraction	انقباضات الرحم

V

Vaccines	اللقاحات
Vacuum drum filtration	الترشيح بأسطوانات الفراغ
Variant colony	مستعمرة مختلفة أو متغيرة أو مغايرة
Variants	متغايرات
Vector	الناقل
Vegetable oils	الزيوت النباتية
Virtual models	نماذج تخيلية
Vmax	سرعة التفاعل القصوي
Volatile fatty acids	الأحماض الدهنية الطيارة
Volatility	التطاير
Volumetric productivity	إنتاجية حجمية

W

Water miscible	القابلة للامتزاج بالماء
Whey	الشرش
Wild-type strain	السلالة البرية أو الأصلية
Wilms tumor	ورم ويلمس
Working volume	حجم العمل

X

X-Ray crystallography	فصل البلورات لأشعة إكس
X-Ray diffraction	حيود الأشعة السينية

obeikandl.com

Y

Yeast extract	مستخلص الخميرة
Yield	الإنتاجية

Z

Zeitgeist (spirit of the time)	روح العصر

obeikandl.com

كشاف الموضوعات

أ

الأجسام المضادة أحادية النسيلة ٥٤، ٥٩، ٦٩

الاحتباس الحراري ٥١، ١٣٢، ٤١٥، ٤٣٥، ٤٥٣، ٤٦٥، ٤٧٥، ٤٧٦، ٤٧٩، ٤٨٠، ٤٨١، ٤٨٢، ٤٨٣، ٤٨٧، ٤٨٨، ٤٩١، ٤٩٤، ٤٩٥، ٥١٣، ٥١٤

الأحماض النووية الريبوزية (الرنا) الدقيقة ٦٢

اختبار تشبع الموضع النشط الاندماجي ١٨٧

ادمصاص أو امتزاز ٢٤٧، ٢٥٠، ٢٥٤، ٣٢٠، ٣٢١، ٣٢٣، ٣٢٧، ٣٢٨، ٤٣١

الأرض المجنبة ٥

إزالة الأحبار العائمة ٤٣١

إزالة الغابات ٤٦٣، ٤٩٢

الاستحلاب ١٩٥

الاستخلاص ٢٥٢، ٢٥٣، ٣٩٠، ٣٩١، ٤١٣، ٤١٨، ٤٢٢، ٤٢٥، ٤٢٧، ٤٢٩، ٤٣١، ٤٧١

الاستدامة ١٥، ٩١، ٩٢، ٩٦، ١٣٥، ٤١٣، ٤٦٢، ٥٠٩، ٥١٧

الاستربتوميسيتات ٣٣، ٣٤، ٣٨

الاستنساخ ٤٥، ١٠٥

أسيتيل-العامل المساعد أ ٤١

أشباه الموصلات ٢٨٦

إعادة التدوير ٢٣٠

الأغشية الحيوية ٢٧٦، ٢٨٠، ٤٣٢

الأكتينوميسيتات ٣٥، ٣٧، ٣٨، ٥٧

الآلات المؤتمتة ١٧٣

إنتاجية حجمية ٢١٩، ٢٥٠

انتقائية المتشابهات ٢٤٢، ٢٥٠، ٢٥٢

الانحباس ٢٤٧، ٢٤٨

الأوكسوتروف (سلالة غير قادرة على إنتاج مركب عضوي معين) ٢٩، ١٨٨

إيديوتروف ٣٨

أيونية المحلول ١٦٢، ٢٤٧

obeikandl.com

ب

البادئ ١٥٦، ١٥٨، ١٥٩، ٣٧٨
بدائل أو متغيرات البروتين ٢٢٥
البروتوبلاست ٦٣
بقايا الخلايا ٢٩٧، ٣٠٢
البكتيريا السالبة لصبغة جرام ٣٠، ٣١، ٣٦
البكتيريا الموجبة لصبغة جرام ٣٠، ٣١، ٣٢، ٣٩
البيئات الغذائية ٢٨، ٤٣، ١٦١، ٢١٨، ٢١٩

ت

التبادل الأيوني ٢٩٨
التبييض ٢٢٧، ٢٣٠، ٤١٣، ٤٢٤، ٤٢٧، ٤٢٨، ٤٢٩، ٤٣٠، ٤٣٢، ٤٣٦
التثبيط الرجعي ٣٠، ٤٣، ٧٧
التجريد الغازي ٤١٧
التحفيز البيولوجي أو التحفيز الحيوي ١١، ١٢، ١٥، ٥٣، ٩٠، ٩١، ٢٠٠، ٢٠٢، ٢٣٢، ٢٣٧، ٢٣٩، ٢٤٣، ٢٥٢، ٣٥٩
التحلل الحيوي ٦، ٢٠٠، ٤٢٣
تخثر البروتين ٢٢٧
تخصصية الإنزيم ٤٣٣، ٤٩٦
تخصصية وسط التفاعل ٧٧، ٧٨، ٢٢٤، ٢٢٥، ٤١٩
التخليق التطفيري الحيوي ٣٧، ٣٨
التخليق الحيوي الاندماجي ٣٨، ٣٩
تدفق الأيض ٣٩، ٤٣، ٨٩، ١٠٣، ١٣١، ١٣٤، ١٣٥، ١٣٨
الترشيح الدقيق ٢١٩، ٣٠٠، ٣٠٦، ٤٧٢
الترشيح الفائق ٢١٩، ٢٢١، ٢٩٨، ٣٠٥، ٣٠٦، ٣١٧، ٣٣٦، ٣٣٨، ٤٦٧، ٤٧١، ٤٧٢
الترشيح فائق الغشائية ١٦٢
التطفيرات الموجهه-المكان ٧٧
التعبير الجيني ٦٢، ٩٥
التعبير المفرط ٤٢، ٤٥، ١١٥، ١٢٩، ١٣١، ١٣٣
التغذية المتقطعة ٢٩
التغذية المستمرة ١٧٥، ٢٢٥، ٢٥٦
تغذية على دفعات ٢١٩، ٢٥٥، ٢٥٦
التفاعلات الهدمية ٤٠
التفاعلات ثنائية القطب ٢٧٤
التقطير التجزيئي ٣١٠
التنظيم الرجعي ٤١
توازن الكتلة الحيوية ١٦٥

ث

ثابت التفاعل ٧٧
ثابت تثبيط الإنزيم ٧٧

ج

جرثومة ٢٣، ٢٨

obeikandl.com

ح

الحساسات الحيوية ٢٣٢، ٢٨٥، ٢٨٦، ٢٨٧
الحساسات القابلة للسحب ١٦٩
الحقن أو التلقيح ١٥٦، ١٥٧، ١٥٨، ١٦٦، ١٧٤، ٤٦٧
الحيوانات المعدلة وراثياً ٧٤، ٥٠٣

خ

خارج الخلية ٤١، ٥٣، ٧٢، ٧٥، ٩٤، ٢١٧، ٢١٨، ٢١٩، ٢٢٤، ٣٣٦، ٣٧٩، ٤٢٠
الخلايا الجذعية ٢٨٨

د

داخل الخلية ٥٢، ٧٩، ١٢٤، ١٢٥، ١٣١، ١٣٤، ٢١٠، ٢٣٣، ٢٤٤، ٢٩٧
درجة الأوكتان ٥١

ر

الرابطة الببتيدية ٤٠

ز

زراعة الأنسجة ٢٧٧

س

السلالة الأصلية ٥٢، ١٨٦، ١٩٦، ١٩٨، ٢٠٠

ش

شفرات التقليب ٢٥٦
الشفرة الوراثية ٦٣

ص

صدادات ١٦٧، ١٧٦، ٢٥٦
صورة محملة أو مقيدة ١٢

ط

الطحالب الدقيقة ٩، ٩١
الطرد المركزي ٧١، ١٧٩، ١٧١، ٢٩٨، ٣٠١، ٣٠٢، ٣٣٥، ٣٣٨
طي البروتين ٧١، ٧٨، ١٩٧

ع

العلاج المناعي ٦٦
عملية الاستخلاص ٤١٨، ٤٢٢، ٤٢٥، ٤٢٧

غ

الغرويات ٢٨١، ٢٩٩

obeikandi.com

ف

فترة عمر الرف (التخزين) ٢٢٧
الفصل الغشائي الكهربائي ٣٢٩، ٣٣٠، ٣٣٥
الفصل اللوني الإزاحي ٣٢٤
الفصل اللوني الانجذابي ٢٩٨، ٣٢٥، ٣٣٧
الفصل اللوني التبادلي للأيونات ٣٢٥، ٣٣٨
الفصل اللوني ذو التفاعلات الكارهة للماء ٣٢٥
في التجارب المعملية أو في المختبر (خارج الخلايا) ٥٤

ق

قابلة للتخمير ٥٠

ك

الكاتيونات ٢٤٢، ٢٥٢، ٣٠٢، ٣٢٥، ٣٣٠، ٣٣٥، ٣٩٨
الكائن المطفر أو المعدل ٢٧، ٣٦، ٣٧، ٣٨، ٣٧٧، ٣٧٨
الكائنات حقيقية النواة ٧١، ٧٢، ٧٣، ١٠٦، ١٠٨، ١١٦، ١٢٩
الكبح الهدمي ٢٢٠
الكحول الإيثيلي الحيوي ٩، ١١

ل

اللاقح أو البادئ أو الحاقن ٧١، ١٥٦، ١٥٨، ١٥٩، ١٦٩، ١٧٠، ١٧٩
لاهوائية ٢٢، ٤٠، ٤٨، ٥١، ١٣١، ١٣٩، ١٥٦، ١٧٧، ٣٣٢، ٤٦٩، ٤٧٠

م

المادة المدمصة ٢٢٢
متخصص للسلالة ٥٤
مثبطات المناعة ٥٧
المحاصيل المعدلة وراثياً ٤٩٥، ٥١٥
المحفز الحيوي ٢٠٠، ٢٢٥، ٢٣٧، ٢٣٨، ٢٣٩، ٢٤٠، ٢٤٢، ٢٤٣، ٢٤٤، ٢٤٥، ٢٤٦، ٢٤٧، ٢٤٨، ٢٤٩، ٢٥٠، ٢٥١، ٢٥٣، ٢٥٤، ٢٥٥، ٢٥٦، ٢٥٧، ٢٥٩، ٢٩٥
مرحلة النمو الأسي أو الإطرادي أو التصاعدي ٤٢، ١٥٩، ٢١٩
المستحلبات الحيوية ٥٣، ٣٣٨
المصافي الحيوية أو البيولوجية ١٠، ٩٢، ٩٩، ١٠٠، ١٢٨، ٤١٥، ٤٣٤، ٤٦١، ٤٦٢، ٤٩٤، ٤٩٦
المضاد للبكتيريا ٢٦، ٣٠، ٣٤، ٥٤
المطهرات ٢٣

obeikandl.com

معدل النمو النوعي ١٥٧، ١٥٩، ١٦٤، ١٦٥، ١٦٦، ٢١٩
المعلمات الحيوية المستشعة ٢٦٨
المعلوماتية الحيوية ٣
المفاعل الحيوي ٣، ١٠، ١٧١، ٢٤٦، ٢٨٧، ٢٩٦، ٢٩٧، ٣٠١، ٣١٠
الملونات الحيوية ١، ١٠
منتجات الأيض الأولي ٢١٧، ٢١٨
منتجات الأيض الثانوي ٣٧، ٥٤، ٢٢٤، ٣٨٧
المواد المقللة للتوتر السطحي ٢٥٥، ٢٧٥، ٢٧٧، ٣٠٢، ٤٢٠

ن

النفاذية ٣٦، ٤٢، ١٠٣، ٢٤٣، ٢٩٨، ٣٠٩
النمذجة ٩٠، ٩٥، ٩٨، ١٢٢، ١٣٤، ١٣٥، ١٤٢، ١٨٣، ٢٥٧، ٢٥٨، ٢٥٩

هـ

هندسة الإنزيمات ١، ١١
الهندسة الأيضية ١، ٣٩، ٤٣، ٩٢، ٩٥، ٩٦، ٩٧، ٩٨، ١٠٠، ١٠٢، ١٠٣، ١٠٤، ١٠٥، ١١٥، ١١٦، ١٢٧، ١٢٨، ١٢٩، ١٣٠، ١٣١، ١٣٢، ١٣٤، ١٣٥، ١٣٩، ١٤٠، ٢٤٣
الهندسة الحيوية ٣٦، ٣٧٥

و

الوقود الحيوي ١، ١٤، ١٢٨، ٢٢٧، ٢٣١، ٢٣٤، ٤١٣، ٤٤٣، ٤٤٥، ٤٤٦، ٤٤٩، ٤٥٢، ٤٥٣، ٤٥٤، ٤٥٧، ٤٥٨، ٤٦١، ٤٦٢، ٤٧٦، ٤٩١، ٤٩٤، ٤٩٦، ٤٩٧، ٥٠٩، ٥١٣، ٥١٥

obeikandi.com

obeikandl.com

نبذة عن المترجم

السيد أحمد السيد هو أستاذ مساعد علم التقنية الحيوية الصناعية، بكرسي أبحاث المنتجات الحيوية، قسم علم الحيوان، جامعة الملك سعود. كما يشغل وظيفة باحث بقسم كيمياء المنتجات الطبيعية والميكروبية بالمركز القومي للبحوث (جمهورية مصر العربية).

لديه اهتمامات بحثية واسعة في مجال تطوير العمليات الحيوية، التخمير، المحفزات الحيوية، وتطوير وتحسين إنتاج نواتج الأيض الأولية والثانوية والبروتينات باستخدام تقنيات زراعة الكائنات الدقيقة والخلايا الثديية والنباتية في المخمرات المعملية، وكذلك على النطاق الصناعي.

لدى الدكتور السيد أحمد السيد عديداً من الأبحاث العلمية المتخصصة في مجال التقنية الحيوية الصناعية، كما حصل على براءة اختراع تم تسجيلها في أوروبا والولايات المتحدة الأمريكية عن فصل الخلايا الثديية في المخمرات ذات الزراعة المتواصلة، ويشارك في هيئات تحرير الكثير من المجلات العلمية المرموقة.

حصل على درجة البكالوريوس في علم الأحياء الدقيقة من جامعة عين شمس (جمهورية مصر العربية)، ودرجة الماجستير في الكيمياء الحيوية من جامعة القاهرة (جمهورية مصر العربية)، ودرجة الدكتوراه في مجال التقنية الحيوية الصناعية من جامعة براونشفايغ (ألمانيا).

كما عمل بعد الحصول على درجة الدكتوراه في شركة مليتيني بيوتك للتقنية الحيوية (ألمانيا) على تطوير الإنتاج التخميري للبروتينات البشرية باستخدام الزراعة المتواصلة للخلايا الثديية. وعمل بعد ذلك كأستاذ مساعد في الجامعة الفيدرالية في ريو دي جانيرو (البرازيل).

obeikandi.com

obeikandl.com